Aus dem
Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor:
Prof. Dr. med. Günter Schultz
ehemals: Prof. Dr. med. Hans Herken

Enkephalinabbau an Zellkulturen des Zentralnervensystems mittels einer neuen H P L C - Analytik

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Palenker, Jochen
aus Berlin-Nikolassee

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549615_0064

Aus dem Pharmakologischen Institut der Freien Universität Berlin
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. med. Günter Schultz
ehemals: Prof. Dr. med. Hans Herken

Enkephalinabbau an Zellkulturen des Zentralnervensystems mittels einer neuen H P L C - Analytik

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Palenker, Jochen
aus Berlin - Nikolassee

Referent: Prof. Dr. med. Hans Herken

Korreferent: Prof. Dr. med. Werner Reutter

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 14.04.1985

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	Einleitung	5
2	Methodik	14
2.1	Zellkultivierung	14
2.1.1	N 1 E 115 Neuroblastomazellen	14
2.1.2	Primäre Astrocyten	14
2.2	Aufarbeitung des Zellmaterials	16
2.2.1	Herstellung von Zellsuspensionen	16
2.2.2	Herstellung einer Rohmembranfraktion ("crude membranes")	16
2.2.3	Herstellung reiner Plasmamembranen	17
2.2.4	Inkubationsvorgang	19
2.3	Analytik der Enkephalinmetabolite	21
2.3.1	Trennung der Enkephalinmetabolite mittels Dünnschichtchromatographie	21
2.3.2	Trennung der Enkephalinmetabolite mittels H P L C	21
2.4	Proteinbestimmung	27
2.5	Messung der Radioaktivität	27
2.6	Statistische Auswertung	28
3	Material	29
4	Ergebnisse	31
4.1	Beurteilung des H P L C - Verfahrens zur Trennung der tyrosinhaltigen Enkephalinmetabolite	31
4.2	Abbau von $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin durch Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115) (Suspensionen, Rohmembranfraktionen, reine Plasmamembranfraktionen)	34

Seite

4.2.1 Wirkung von Bestatin, Captopril und Thiorphan auf den $^{3}H(Leu^{5})$enkephalinabbau durch Membranen von Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115) 43

4.3 Abbau von $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin durch primäre Astrocyten (Suspensionen, Rohmembranfraktionen, reine Plasmamembranfraktionen) 44

4.3.1 Wirkung von Bestatin, Captopril und Thiorphan auf den $^{3}H(Leu^{5})$enkephalinabbau durch Membranen primärer Astrocyten 51

5 Diskussion 53

6 Zusammenfassung 65

7 Literaturverzeichnis 67

1 Einleitung

1975 entdeckten John Hughes und Hans W.Kosterlitz von der Universität Aberdeen die Pentapeptide Methionin- und Leucin-Enkephalin (Abb.1), zwei endogene Liganden der Opiatrezeptoren (Hughes et al., 1975). Bereits zuvor war bekannt, daß Opiatrezeptoren in jenen Hirn- und Rückenmarksregionen am höchsten konzentriert sind, die neurophysiologisch gesichert im Schmerzperception und Integration sowie emotionelle Wahrnehmung involviert sind. Schon in ihrer Erstbeschreibung haben Hughes und Kosterlitz eine Transmitterrolle für die Enkephaline postuliert. Auch eine Neuromodulatorfunktion ist diskutiert worden (Emson, 1979). In Hinblick auf Neurotransmitter sind die Distribution, die Synthese, die Freisetzung, die Rezeptorinteraktion, sowie die Inaktivierung von besonderer Bedeutung.

Tyr-Gly-Gly-Phe-Met-OH

Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu-OH

Abb.1: Aminosäuresequenzen von Methionin- und Leucin-Enkephalin

Bei der Bestimmung der Verteilung der Enkephaline wurde ein besonders hoher Gehalt im Globus pallidus gefunden (Hong et al., 1977; Rossier et al., 1977; Kobayashi et al., 1978; Emson et al., 1980). Immunhistologisch ließ sich zeigen, daß die enkephalinhaltigen Neurone ihre Perikarya im Striatum haben (Cuello und Paxinos, 1978), so wie das Striatum noch Ursprung anderer enkephalinerger Neurone ist (Emson, 1979). Die Synthese erfolgt aus längerkettigen Precursoren, dem Proenkephalin A und dem Proenkephalin B (Übersicht bei Höllt (1983)).

Für Methionin- und Leucin-Enkephalin konnte in Experimenten an Schnitten des Globus pallidus der Ratte ein calciumabhängiger Mechanismus der Freisetzung gezeigt werden (Bayon et al., 1978; Iversen et al., 1978). Desgleichen wurde an striatalem Gewebe in vitro demonstriert (Henderson et al., 1978; Osborne et al., 1978). Die Enkephaline binden mit besonders hoher Affinität an Opiatrezeptoren der Subklasse delta und haben eine rund hundertmal höhere Affinität zu den Opiatrezeptoren als Morphin (Chang et al., 1982), weshalb sie auch Opiatrezeptoren vom Enkephalintyp oder Enkephalinrezeptoren genannt werden.

In Hinblick auf Freisetzung und Rezeptorinteraktion verhalten sich die Enkephaline somit prinzipiell analog den klassischen Neurotransmittern Noradrenalin und Acetylcholin.

Eine entscheidene Bedeutung bei der Regulation der Transmitterwirkung kommt der Inaktivierung der Botenstoffe zu. Bei der Inaktivierung des Noradrenalins werden drei verschiedene Mechanismen unterschieden:
1. der "Reuptake", also die Wiederaufnahme in das Nervenende, 2. die enzymatische Metabolisierung durch die Katechol-O-Methyltransferase (COMT) zu Normetanephrin (3-O-Methyl-Noradrenalin) und 3. die ebenfalls enzymatische Inaktivierung zu 3,4-Dihydroxy-Mandelsäure durch die Monoaminoxidase (MAO). Für die Noradrenalininaktivierung steht jedoch die Wiederaufnahme des unveränderten Transmitters bei weitem im Vordergrund.

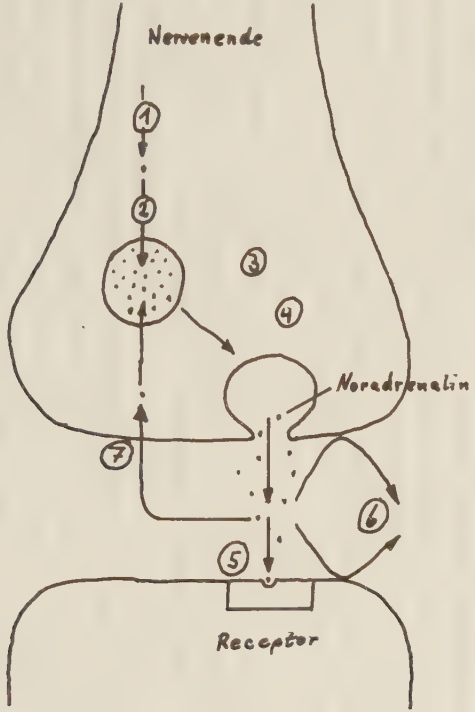
Acetylcholin wird nur enzymatisch inaktiviert; überwiegend die plasmamembrangebundene, neuronale Acetylcholinesterase als spezifisches Enzym und die unspezifische Cholinesterase sind daran beteiligt. Eine Wiederaufnahme von intaktem Acetylcholin findet nicht statt, jedoch werden die Spaltprodukte zur Resynthese in die Nervenendigung aufgenommen.

Nachdem lange Zeit angenommen wurde, daß eine Wiederaufnahme der Enkephaline in die Neurone keine Rolle spielt, konnte in jüngster Zeit gezeigt werden, daß an delta-Rezeptor-tragenden, met-enkephalinergen Maus-Neuroblastomazellen des Stammes N 1 E 115 in Monolayern ein Mechanismus der Internalisation des Rezeptor-Liganden-Komplexes existiert (Chang et al., 1982; Simantov et al., 1982; Blanchard u. Chang, 1983). Die physiologische Bedeutung dieser Aufnahme in die Neurone ist bislang unklar.

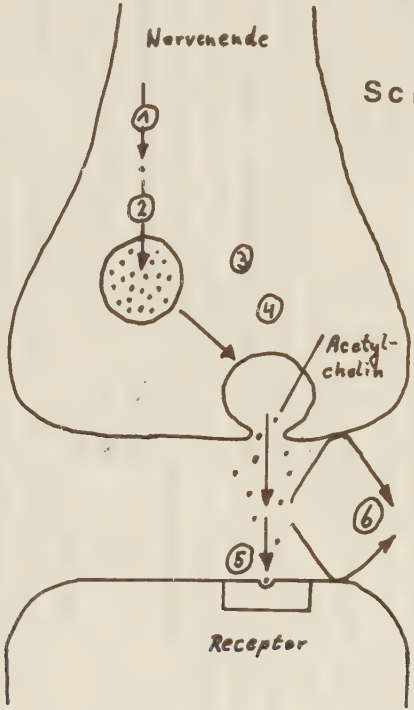
Jahrelang war die Erforschung des Enkephalinabbaus auf die Suche nach spezifischen Abbauenzymen, analog der Acetylcholinesterase, fokussiert. Einige Enzyme sind schon relativ früh nach Beginn der Arbeiten auf diesem Gebiet, aus heutiger Sicht sicher voreilig, als Enkephalinasen bezeichnet worden. Mehrere Peptidasen konnten dargestellt werden, die mit mehr oder weniger großer Affinität und Substratspezifität Enkephaline in niedere Peptide und Aminosäuren zu spalten vermögen. Schema 1 zeigt jeweils eine noradrenerge, eine cholinerge und eine enkephalinerge Synapse im Vergleich.

Mit Ausnahme nur einer Arbeit an opiatrezeptortragenden Neuroblastomazellen, die nur ein unspezifisches Enzym beschreibt (Hazum et al., 1979), wurden vor Beginn dieser Studie Untersuchungen zum Enkephalinabbau lediglich an Hirnhomogenaten oder Synaptosomenpräparationen durchgeführt. Die ersten so gearteten Studien (Hambrook et al., 1976; Meek et al., 1977; Marks et al., 1979) erbrachten die Beschreibung von Aminopeptidaseaktivitäten. Bei der Fortführung derartiger Untersuchungen wurden verschiedene andere Peptidasen beschrieben, auf die und deren Inhibition im Kontext in der Diskussion eingegangen werden soll. An dieser Stelle soll lediglich auf die Arbeiten der Gruppen um Malfroy (1978), Sullivan (1978) und Gorenstein und Snyder (1980) hingewiesen werden. Diese Gruppen stellten Enzyme dar, die sie Enkepha-

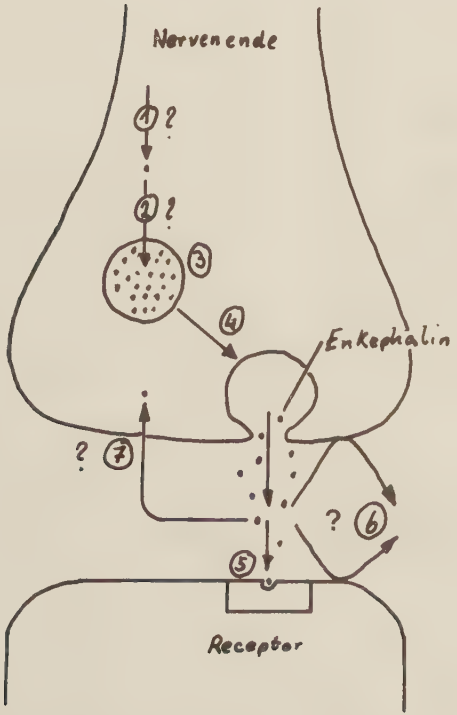
Schema 1


Nervenende
1
2
3
4
Noradrenalin
7
6
5
Receptor

a


Nervenende
1
2
3
4
Acetyl-
cholin
6
5
Receptor

b



C

Schema 1: Vergleich einer noradrenergen, einer cholinergen und einer enkephalinergen Synapse
a) noradrenerge Synapse
b) cholinerge Synpase
c) enkephalinerge Synapse
. = Transmitter 1 Synthese, 2 vesikuläre Aufnahme, 3 Vesikel, 4 Freisetzung, 5 Interaktion mit dem postsynaptischen Rezeptor, 6 Inaktivierung durch enzymatische Spaltung, 7 Inaktivierung durch Wiederaufnahme

linase A (Malfroy et al., 1978; Sullivan et al., 1978) und B (Gorenstein u. Snyder, 1980) nannten. Ergänzend beschrieben Malfroy und Mitarbeiter (1978) eine Steigerung der Enkephalinase A - Aktivität unter Langzeitbehandlung der Tiere mit Morphin. Schema 2 gibt einen Überblick über die enkephalinabbauenden Peptidasen.

Diese Untersuchungen an Hirnhomogenaten erlauben jedoch keine Kompartimentierung der Enzyme bzw. deren Lokalisation (z.B. auf der Nerven- und/oder Gliazelle).

Mit der vorliegenden Studie soll versucht werden, die Fragen nach der Lokalisation der Peptidasen, soweit an den verwendeten Zellen vorhanden, zu beantworten. Hierzu wurden Zellkulturen der beiden dominierenden Elemente des Zentralnervensystems, der Glia- und der Nervenzelle verwandt. Als gliales Modell dienten primäre Astrocyten der Ratte, während das neuronale Modell in Neuroblastomazellen des Stammes N 1 E 115 bestand, dessen Met-Enkephalingehalt und Besitz von delta-Rezeptoren bereits erwähnt wurde. Neben Zellsuspensionen wurden aus den Zellkulturen auch Membransuspensionen hergestelllt, um der Frage etwaiger Membranloklisation nachzugehen.

Untersuchungen an Zellkulturen bzw. an aus ihnen hergestellten Membranpräperationen machen es schon aus Gründen des Materialaufwandes erforderlich, mit geringen Mengen auszukommen. Der Versuch der Charakterisierung hochaffiner Peptidasen erfordert außerdem die Arbeit mit nanomolaren Substratkonzentrationen. Die Verwendung derartig geringer Konzentrationen hat ein empfindliche Trenn- und Analyse-Methodik zur Bedingung. Da es zum Zeitpunkt des Beginns dieser Arbeit nur die ebenfalls im Methodenteil beschriebene umständliche und ungenaue Dünnschichtchromatographie-(TLC)-Methode gab, wurde zum Zweck dieser Untersuchung eine HPLC-

Enkephalin-abbauende Enzyme

	Enzyme	Tyr-haltiger Metabolit
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Aminopeptidasen	Tyr
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Dipeptidylaminopeptidasen	Tyr-Gly
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Dipeptidylcarboxypeptidasen a) Enkephalinase A b) Angiotensin-converting Enzyme (ACE)	Tyr-Gly-Gly
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Carboxypeptidasen	Tyr-Gly-Gly-Phe

Schema 2: Aufgeführt sind lösliche und membranständige Paptidasen, die die Enkephaline abbauen können. Als Produkte dieser enzymatischen Reaktionen sind die tyrosinhaltigen Metabolite genannt. Die Pfeile in der (Leu^5)enkephalin-Sequenz markieren die jeweiligen Angriffstellen der entsprechenden Enzyme.

(Hochdruckflüssigkeitschromatographie)-Methode zur Trennung der tyrosinhaltigen Enkephalinmetabolite und des Enkephalins entwickelt.

Das Interesse am Enkephalinabbau wurde durch mehrere Faktoren stimuliert. Hier wäre die Tatsache zu nennen, daß antinociceptive Wirkungen der Enkephaline nur bei Gabe in die Hirnventrikel (Beluzzi et al., 1976; Buscher et al., 1976; Bradbury et al., 1977; Bajusz et al., 1978), in die Cisterna magna (Ueda et al., 1979) oder in das periaquaeductale Grau (Chang et al., 1976; Pert et al., 1976; Simon et al., 1979) demonstriert werden konnten und diese auch nur von kurzer Dauer waren. Bei intravenöser Applikation beträgt die Halbwertszeit der Enkephaline 2-4 Sekunden (Dupont et al., 1977). Eine Verlängerung der Enkephalinwirkung konnte theoretisch auf zwei Wegen erreicht werden: 1. Abwandlung des Enkephalins hin zu stabileren Derivaten, z.B. durch Einführung von D-Aminosäuren, was auch durchgeführt wurde, und 2. die Hemmung des Abbaus von nativem Enkephalin durch Inhibition spezifischer Peptidasen analog der Acetylcholinesterase. Die letztere Möglichkeit ist jedoch an die Existenz eines dominierenden Inaktivierungsmechanismus gebunden, da bei Existenz mehrerer paralleler Inaktivierungsmechanismen ein nicht inhibierter Mechanismus die Funktion des inhibierten zu übernehmen vermag.

Die Vorstellung, durch Hemmung des Enkephalinabbaus mittels Pharmaka im synaptischen Spalt eine höhere Enkephalinkonzentration am Rezeptor zu erreichen ist bereits in in vivo-Experimenten mit eingeschränktem Erfolg umgesetzt worden (Roques et al., 1980).

In Bezug auf die analgetische Wirkung der Enkephaline sind mehrere Modelle des Wirkungsmechanismus entwickelt worden, von denen hier dasjenige von Leslie L.Iversen (1979) von der

Universität Cambridge über den hypothetischen Mechanismus auf spinaler Ebene abschließend exemplarisch demonstriert und und erläutert werden soll (Abb.2). Die aus dem peripheren Nocirezeptor eingehende Schmerzinformation wird an ihrer ersten Synapse im Dorsalhorn des Rückenmarks durch Substanz P, ebenfalls einem Neuropeptid, transmittiert.

Durch enkephalinerge Interneurone freigesetztes Enkephalin vermag über die Inhibition der Substanz P - Freisetzung die Weiterleitung des Schmerzimpulses zu vermindern bzw. zu unterdrücken. Durch Hemmung des Enkephalinabbaus sollte es somit möglich sein, einen analgetischen Effekt zu erzielen.

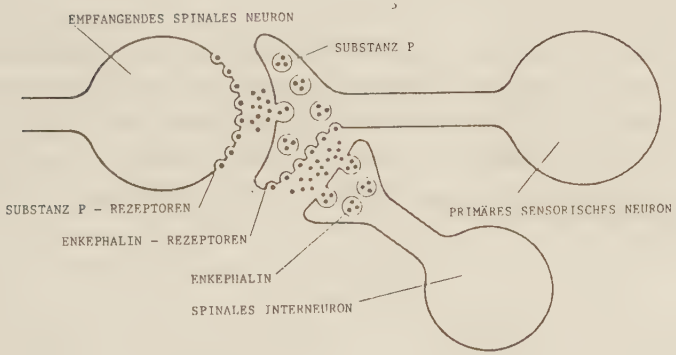


Abb.2: Hypothetischer Wirkmechanismus der Enkephaline nach Iversen (1979), Erläuterung im Text

2 Methodik

2.1 Zellkultivierung

2.2.1 Neuroblastomazellen

Die Experimente wurden an etablierten Zellinien des Mäuseneuroblastomas C1300 durchgeführt.

Das Neuroblastom C1300 ist ein spontan im Hirn der Maus (Stamm A/J) gewachsener bösartiger Tumor, der anschließend in der Bauchhöhle weiter angezüchtet wurde. Der Klon N 1 E 115 wurde von Amano et al. (1972) als Zellinie etabliert.

Die N 1 E 115 Zellen (25.-35. Passage) wuchsen als Monolayer-Kulturen in Plastikflaschen mit einer Grundfläche von 75 cm^2. Die Zusammensetzung des Kulturmediums ist in der Tabelle 1a angegeben.

Nach Zugabe von 20 ml des Mediums wurden die Kulturen im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Hanau) in einer Atmosphäre hoher Luftfeuchtigkeit (8% CO_2, 92% Luft) bei 37°C gezüchtet. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Die Zellen wurden am 7. Tag nach der Subkultivierung für die Experimente benutzt.

2.1.2 Primäre Astrocyten

Die Experimente wurden an Astrogliazellen in Primärkultur durchgeführt. Die Kultivierung ist von Booher und Sensenbrenner (1972) erstmalig beschrieben worden.

Zwei Tage alten Ratten wurden die Gehirne entnommen und die Cerebralhemisphären unter aseptischen Bedingungen isoliert.

Sorgfältig wurden die Meningen abgezogen und die Hemisphären durch ein steriles Nylonsieb (80 µm Porengröße) in das Kulturmedium gepreßt.

Die Zusammensetzung des verwendeten Kulturmediums ist in der Tabelle 1b angegeben.

Die Zellen wuchsen als Monolayer-Kulturen in Plastikflaschen mit einer Grundfläche von 150 cm^2. Nach Zugabe von 50 ml des Mediums wurden die Kulturen im Brutschrank (Cytoperm, Heraeus, Hanau) in einer Atmosphäre hoher Luftfeuchtigkeit (5% CO_2, 95% Luft) bei 37°C gezüchtet. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Die Zellen wurden am 21. Tag für die Experimente benutzt.

Die Kulturen wurden üblicherweise regelmäßig durch ein Phasenkontrast-Mikroskop beobachtet.

Tabelle 1

a) Kulturmedium für N 1 E 115 - Zellen

Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium (DMEM) ergänzt durch:
10% foetales Kälberserum
4 mM L-Glutamin
2,5 ml/l Konzentrat nicht-essentieller Aminosäuren
50 U/ml Penicillin G
50 µg/ml Streptomycin

b) Kulturmedium für primäre Astrocyten
Minimum Essential Medium (MEM) mit Earle's Salzen ergänzt durch:
20% die ersten 7 Tage, dann 10% foetales Kälberserum
2 mM L-Glutamin
2,2 g/l $NaHCO_3$
50 U/ml Penicillin G
50 µg/ml Streptomycin

2.2 Aufarbeitung des Zellmaterials

2.2.1 Herstellung der Zellsuspensionen

Vor der Ernte der Zellen wurde das Kulturmedium mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Flaschen wurden geöffnet und die Zellschicht vorsichtig mit einem Gummischaber in etwa 2 ml Krebs-Ringer-Tris-Puffer (KRT) (NaCl 128 mM, $CaCl_2$ 1,4 mM, $MgCl_2$ 1,4 mM, KCl 5 mM, Tris-HCl 20 mM und D-Glucose 5 mM) abgeschabt und aufgenommen. Die weitere Aufarbeitung erfolgte bei 4°C. Die folgende Zentrifugation für 10 Minuten bei 200 g wurde in der Laborzentrifuge (Typ Minifuge, Fa. Heraeus-Christ, Hanau) durchgeführt. Das Sediment wurde durch Resuspendieren in 5 ml KRT-Puffer und dreimaliger Wiederholung des beschriebenen Zentrifugationsvorgangs gewaschen. Für die Untersuchungen (Proteinbestimmung, Inkubationsvorgang) wurde das Sediment in 2 ml KRT-Puffer aufgenommen.

2.2.2 Herstellung einer Rohmembranfraktion ("crude membranes")

Die Rohmembranen ("crude membranes") von Neuroblastomazellen bzw. primären Astrocyten wurden in Anlehnung an Gilbert et

al. (1982) hergestellt. Zunächst wurde das Medium mittels einer Wasserstrahlpumpe aus den Kultivierungsflaschen abgesaugt. Anschließend wurden die Flaschen geöffnet und die als Monolayer gewachsenen Zellen in 5 ml Phosphatpuffer (Na_2HPO_4 1,15 g/l, KH_2PO_4 0,2 g/l, NaCl 8,0 g/l und KCl 0,2 g/l) vorsichtig abgeschabt und die Suspension in eine Homogenisiergefäß pipettiert. Unter Verwendung eines Potter-Elvejhem S Homogenisators wurden die Zellen sodann durch 30 abwärtsgerichtete, manuell ausgeführte Bewegungen eines Kolbens, der mit 700 Umdrehungen pro Minute (upm) rotierte, homogenisiert. Der beschriebene Homogenisationsvorgang fand unter Kühlung durch ein Eisbad statt. Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten bei 4°C. Das Homogenat wurde bei 40.000 g in einem Festwinkelrotor (Typ 60 Ti, Fa. Beckman) mit einer Ultrazentrifuge (Typ L8-70, Fa. Beckman) 15 Minuten zentrifugiert und das Sediment in Krebs-Ringer-Tris-Puffer (KRT) (NaCl 128 mM, $CaCl_2$ 1,4 mM, $MgCl_2$ 1,4 mM, KCl 5 mM, Tris-HCl 20 mM und D-Glucose 5 mM) resuspendiert. Um die Membranfraktion zu waschen, wurden die Resuspendierung und der Zentrifugationsvorgang dreimal wiederholt. Nach der letzten Zentrifugation wurde das Sediment in 2 ml KRT-Puffer resuspendiert und für die Proteinbestimmung sowie den Inkubationsvorgang verwendet.

2.2.3 Präparation reiner Plasmamembranen

Bei der hier beschriebenen Methode handelt es sich um eine Modifikation der Methoden von Warren et al. (1966) und Brunette und Till (1971). Zunächst wurde das Medium mit einer Wasserstrahlpumpe aus den Kultivierungsflaschen abgesaugt und je 8 ml 0,01 M Phosphatpuffer pH 7,4, der außerdem 0,136 M NaCl und 2,7 mM KCl enthielt, auf die Monolayer gegeben. Nach einer Minute wurde der Puffer entfernt und durch je 7 ml 0,02 m Phosphatpuffer mit 0,144 M NaCl pH 7,4

ersetzt. Anschließend wurden die Kultivierungsflaschen aufgebrochen, die Zellen vorsichtig abgeschabt und als Suspension in ein 50 ml Zentrifugenglas pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 250 g für 5 Minuten in der Laborzentrifuge (Typ Minifuge, Heraeus-Christ). Das Sediment wurde in 50 ml 1 mM $ZnCl_2$-Lösung resuspendiert und 8 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Suspension bei 250 g für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 45 ml 0,02 M Phosphatpuffer pH 7,4 aufgenommen, 15 Minuten im Eisbad inkubiert und dann mit 35 manuell ausgeführten Hüben bei 700 Umdrehungen pro Minute in einem eisgekühlten Homogenisator (Potter-Elvejhem S) homogenisiert. Im Anschluß wurde das Homogenat bei 500 g für 15 Minuten zentrifugiert und sodann das Sediment in 3 ml vorgekühlter Oberphase eines Zweiphasengradienten resuspendiert. Ober- und Unterphase des Zweiphasengradienten entstanden nach Durchmischen der folgenden Lösungen in einem Schütteltrichter und der anschließenden Phasentrennung im Kühlraum: 200 g einer 20%igen Dextran 500 Lösung, 103 g einer 30%igen Polyethylenglykollösung (PEG 8.000), 99 ml H_2O, 333 ml 0,22 M Phosphatpuffer (Natriumsalz pH 6,5) sowie 80 ml 10 mM $ZnCl_2$-Lösung. Das in der Oberphase resuspendierte Sediment wurde mit 4 ml Unterphase durchmischt und in einem Ausschwingrotor (SW 25.1, Fa. Beckman) für 10 Minuten bei 11.700 g zentrifugiert. Die Membranfraktion an der Grenzfläche zwischen Ober- und Unterphase wurde abgetragen und nach erneuter Vermischung mit den Komponenten des Zweiphasengradienten wieder für 10 Minuten in oben beschriebener Weise zentrifugiert. Nach nochmaliger Wiederholung dieses Schrittes erfolgte dann das Vermischen der Membranfraktion mit ca. 25 ml 0,02 M Phosphatpuffer mit 0,75 mM EDTA, sowie anschließende Zentrifugation für 10 Minuten in der Laborzentrifuge bei 2300 g. Dieser Waschvorgang wurde noch zweimal wiederholt, wobei beim letzten Waschgang der Puffer ohne EDTA-Zusatz verwendet wurde. Das Sediment wurde zur Inkuba-

tion verwendet. Zur Herstellung der elektronenoptischen Bilder wurde als weiterer Reinigungsschritt ein linearer Saccharosegradient angeschlossen. Hierzu wurde das Sediment in 1,2 ml 25%iger Saccharoselösung resuspendiert. Die Suspension, die sich bereits in vorgekühltem Zustand befand, wurde auf einen linearen Saccharosegradienten (30-50%), bestehend aus 10 ml, aufgetragen und mit 6 ml 12%iger Saccharose überschichtet. Nun erfolgte eine Zentrifugation im Ausschwingrotor (SW 25.1, Fa. Beckman) 35 Minuten bei 30.000 g. Die bei 40%iger Saccharose erscheinende Plasmamembranbande wurde entfernt und nach Verdünnung mit Aqua bidest. (2 ml + 7 ml) im Festwinkelrotor (Typ 60 Ti, Fa. Beckman) für 30 Minuten bei 27.300 g zentrifugiert und das resultierende Sediment als Plasmamembranen verwendet. Schema 3 zeigt vereinfacht den Ablauf der Plasmamembranisolierung.

2.2.4 Inkubationsvorgang

Das Zell- bzw. Membransediment wurde in Krebs-Ringer-Tris-Puffer (KRT) pH 7,4 (1 mg Protein pro 1 ml) resuspendiert. Jeder Inkubationsansatz enthielt 40 µl dieser Suspension, 40 µl KRT-Puffer bzw. Hemmstofflösung und 20 µl ^{3}H-markierter Leucin-Enkephalinlösung. Die Ansätze wurden mit Leucin-Enkephalin in Eppendorfreaktionsgefäßen bei verschiedenen Temperaturen unterschiedlich lang inkubiert. Dieser Inkubation ging eine zehnminütige Vorinkubationsphase mit Hemmstoff- bzw. Pufferlösung bei gleicher Temperatur voraus. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 10 µl 0,8 N HCl und Einfrieren in flüssigem Stickstoff gestoppt. In Parallelansätzen, in denen das Suspensionsvolumen durch Puffer ersetzt war, wurden sogenannte Leerwerte bestimmt, die dann bei der Auswertung von den eigentlichen Probenwerten abgezogen wurden.

(1) Suspendieren der Zellen
(2) Zentrifugation 5 min, 250 g
(3) Sediment-Resuspendierung in $ZnCl_2$-Lösung, Inkubation 8 min, 25°C
(4) Zentrifugation 5 min, 250 g
(5) Sediment-Resuspendierung in Phosphatpuffer, Inkubation 15 min im Eisbad
(6) Homogenisation, 35 Hübe, 700 Upm
(7) Zentrifugation 15 min, 500 g
(8) Sediment in Oberphase resuspendieren
(9) Zugabe von Unterphase, Vermischung
(10) Zentrifugation 10 min, 11.700 g
(11) Interphase abtragen, zweimalige Wiederholung der Schritte (8) - (11)
(12) Sediment-Resuspendierung in Phosphatpuffer
(13) Zentrifugation 10 min, 2300 g, zweimalige Wiederholung
(14) Sediment

Aliquot	Aliquot
(14a) Verwendung für Inkubations-experimente	(14b) Resuspendierung in 25%iger Saccharose
(15)	Dichtegradientenzentrifugat (Saccharose 30-50%, linear)
(16)	Verdünnung mit H_2O bis zur Isotonie, Zentrifugation 30 min, 27.300 g
(18)	Sediment (EM-Aufarbeitung)

Schema 3: Schematisierter Ablauf der Herstellung reiner Plasmamembranen (Details im Text beschrieben).

2.3 Analytik der Enkephalinmetabolite

2.3.1 Trennung von Enkephalinmetaboliten mittels Dünnschichtchromatographie

Zur dünnschichtchromatographischen Analyse des Leucin-Enkephalins und seiner tyrosinhaltigen Metabolite wurden Silica-Gel-Platten der Firma Whatman verwendet, deren Vorzug u.a. in einer nichtadsorbierenden Konzentrationszone besteht. Es wurden jeweils 10 µl Probe (mit nichtradioaktiven Standardsubstanzen versetzte radioaktive Probe) mit einer Eppendorfpipette punktförmig aufgetragen. Das Laufmittel bestand in Anlehnung an Gorenstein und Snyder (1979) aus Isopropanol : Ethylacetat : 5%iger Essigsäure im Verhältnis 40:40:20. Die Platten wurden über 6 Stunden bei Raumtemperatur in Laufkammern entwickelt. Anschließend wurden die Platten mit Ninhydrin angesprüht, wodurch die Standardsubstanzflecken sichtbar gemacht wurden. Folgende R_f-Werte wurden in Übereinstimmung mit den Angaben von Gorenstein und Snyder ermittelt: Leucin-Enkephalin = 0,56, Tyr-Gly-Gly-Phe = 0,42, Tyrosin = 0,38, Tyr-Gly = 0,24 und Tyr-Gly-Gly = 0,15. Die gefärbten Standardsubstanzflecken wurden sodann vorsichtig quantitativ von der Glasplatte heruntergekratzt. Das Kieselgel wurde in Szintillationsgefäße überführt und nach Zugabe von Szintillationsmedium im Szintillationszähler gemessen.

2.3.2 Trennung der Enkephalinmetabolite mittels HPLC

Die hier beschriebene Methode basiert auf dem Prinzip der Ionenaustauschchromatographie mit Phasenumkehr (reversed-phase-chromatography). Hierzu wurde ein sehr apolares Trägermaterial in Form von Silicagel als stationäre Phase verwendet. Silicagel hat als funktionelle Gruppe einen Octadecylrest ($-(CH_2)_{17}-CH_3$), ein extrem apolarer Rest, der über

eine Si-C-Bindung gebunden ist. Es handelt sich um rundes, poröses Material. Die mobile Phase bestand aus zwei relativ polaren Pufferlösungen, zwei isokratischen Systemen. In diesem System werden apolare Substanzen später eluiert als polare (so z.B. Leu-Enkephalin). Zusätzlich wurde dem ersten isokratischen System der Kationenaustauscher Octansulfonsäure zugesetzt. Mit ihrem Octylrest legt sich die Octansulfonsäure an das apolare Trägermaterial, während die polaren $-SO^-_3$-Reste in die mobile Phase gerichtet sind. Die Sulfonylgruppen treten als Kationenaustauscher mit den polaren Resten der Probenmoleküle in Wechselwirkung. Die Trennung von Tyr-Gly und Tyr-Gly-Gly wird gerade durch diese Wechselwirkungen zwischen den polaren Regionen dieser Peptide mit den $-SO^-_3$-Resten erreicht.

Es erfolgte Koelution des radioaktiven Materials der Probe mit unmarkierten (kalten) Standardlösungen. Die nichtmarkierten Standardsubstanzen zeigen aufgrund der ihnen gemeinsamen Aminosäure Tyrosin typische UV-Absorption. Die UV-spektrophotometrische Messung erfolgte bei 254 nm. Der UV-Detektor erkennt die typische UV-Absorption und damit die Veränderung der Zusammensetzung der mobilen Phase. Er wandelt diese Änderung in ein elektrisches Signal um, welches an einen Schreiber weitergeleitet als Abweichung von der Nullinie sichtbar gemacht wird. Nach Ermittlung der jeweiligen Retentionszeiten für Tyrosin, Tyr-Gly, Tyr-Gly-Gly, Tyr-Gly-Gly-Phe und Leucin-Enkephalin wurde die Radioaktivität entsprechend der UV-Absorption der kalten Standardlösung gesammelt und nach Zugabe von 10 ml Szintillationsmedium im Szintillationszähler gemessen.

Im Einzelnen wurde die Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) unter Verwendung einer sogenannten flußkonstanten Pumpe (Gynkotek, Modell 600/200) und einer Säule aus rostfreiem Stahl mit einer Länge von 125 mm und einem Innen-

durchmesser von 4,1 mm durchgeführt. Die nach der "slurry"-Technik feucht gefüllten Säuren wurden bezogen (Fa. Bischoff, Leonberg). Das Trägermaterial Silicagel hatte eine durchschnittliche Partikelgröße von 5 µm (Hypersil ODS Shandon). Die so definierte stationäre Phase wurde mit zwei isokratischen Systemen beschickt, die als mobile Phase dienten. Das erste System, welches zur Elution von Tyrosin, Tyr-Gly und Tyr-Gly-Gly diente, bestand aus: Citrat-Phosphatpuffer (0,01 M unter Zusatz von 0,3 mM 1-Octansulfonsäure-Monohydrat Natriumsalz als Kationenaustauscher) im Verhältnis 90:10 mit Methanol versetzt und auf einen pH von 3,0 eingestellt. Das zweite isokratische System der mobilen Phase diente zur Elution von Tyr-Gly-Gly-Phe und Leucin-Enkephalin - die Elution von Methionin-Enkephalin ist ebenfalls möglich, wobei die Rentetionszeit zwischen denen für das Tetrapeptid Tyr-Gly-Gly-Phe und Leucin-Enkephalin liegt - und setzt sich aus 0,1 M Phosphatpuffer pH 6,0 und Methanol in der Relation 65:35 zusammen. Die mobilen Phasen wurden vor der Verwendung entgast, da Blasenbildung in der Säulenpackung Einfluß auf die UV-Absorption haben und außerdem Blasenbildung in der HPLC-Apparatur zu Druckschwankungen und Flußstörungen führen kann. Die Proben wurden zur Analytik vorbereitet, indem das darin befindliche denaturierte Protein durch Zentrifugation für 10 Minuten in einer Eppendorf-Laborzentrifuge sedimentiert wurde. 20 µl des Überstandes wurden in ein vorbereitetes Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 5 µl Standardlösung pipettiert. Mittels einer Hamilton-Spritze wurde das Probe-Standard-Gemisch durch einen "stop flow"-Injektor (Modell Rheodyne) in eine 20 µl Dosierschleife injiziert. Durch Drehung des Injektor-Innenkörpers wird die Dosierschleife in den Eluentenstrom gebracht. Die Vorteile dieses Verfahrens bestehen in dem gut reproduzierbaren Volumen und der Tatsache, daß nicht gegen einen Druck injiziert werden muß. Die initiale Flußrate betrug 1 ml pro Minute und wurde nach 4 Minuten auf 2 ml pro Minute erhöht.

Nach 6,8 Minuten wurde auf das zweite isokratische System übergegangen; nach insgesamt 13 Minuten war der gesamte Lauf beendet. Die Retentionszeiten der einzelnen Metabolite betrugen: Tyrosin 4 min, Tyr-Gly-Gly 6 min, Tyr-Gly 7 min, Tyr-Gly-Gly-Phe 9,5 min und Leucin-Enkephalin 12 min. Nach jedem Lauf wurde die Säule für 10 Minuten mit einer Flußrate von 2 ml pro Minute mit Methanol gespült und anschließend 15 Minuten mit einer Flußrate von 4 ml pro Minute mit dem ersten isokratischen System equilibriert und dabei mit Octansulfonsäure, dem verwendeten Kationenaustauscher, beladen. Die Zeitdauer dieses Vorganges ist u.a. durch die mäßige Regenerationsgeschwindigkeit des verwendeten Trägermaterials Silicagel mitbedingt. Abbildung 3 zeigt ein Schema der HPLC-Apparatur, während Abbildung 4 ein schematisches Chromatogramm mit den Daten der Methode darstellt.

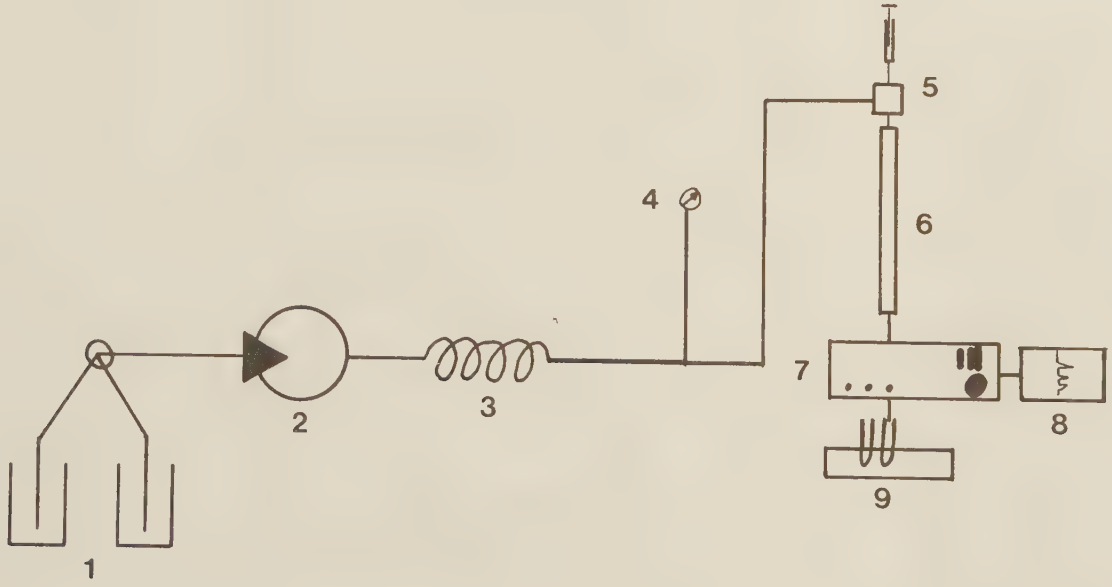


Abb.3: Schema der HPLC-Apparatur
1 - Lösungsmittel-Vorratsgefäße, 2 - Hochdruckpumpe, 3 - Pulsationsdämpfer,
4 - Manometer, 5 - Injektionsspritze mit Injektor, 6 - Säule, 7 - UV-Detektor,
8 - Schreiber, 9- Fraktionssammler

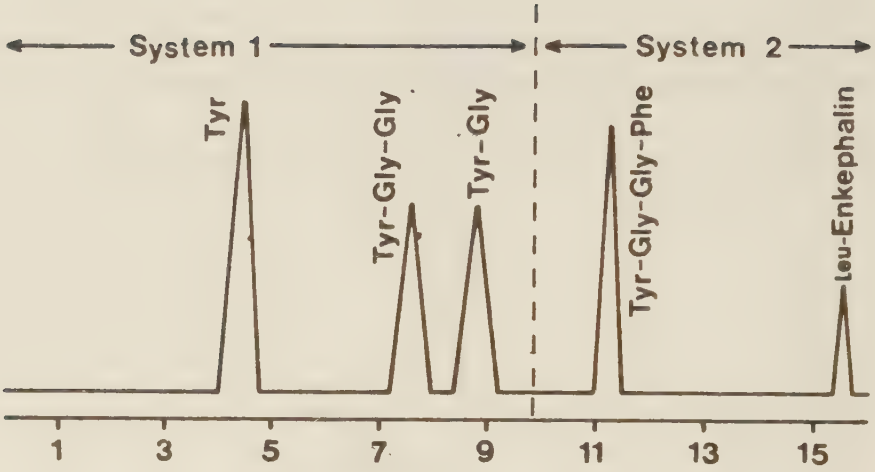


Abb.4: Schematisches Chromatogramm der HPLC-Methode
Flußraten: Initial 1 ml/min, nach 4 min 2 ml/min
Stationäre Phase: Hypersil ODS C18 Shandon 12,5 cm x 4,1 cm, Partikelgröße 5 µm
Mobile Phase: 1. Citrat-Phosphatpuffer (0,01 M + 0,3 mM Octansulfonsäure) pH 3,0 : Methanol (90:10);
2. Phosphatpuffer (0,1 M) pH 6,0 : Methanol (65:35)

2.4 Proteinbestimmung

Das Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry et al. (1951) beruht auf der Überführung des Proteins in einen Kupferproteinkomplex. Aromatische Aminosäuren, die in diesem Komplex vorliegen, reduzieren vermutlich die Phosphormolybdänsäure im Folin-Ciocalteus Reagenz zu Molybdänblau.

Die Proben in mehreren Verdünnungstufen, um die Proteinkonzentration im linearen Extinktionsbereich messen zu können, sowie die Proben einer doppelt angesetzten Eichreihe aus Rinder-Serumalbumin wurden gemeinsam in Eppendorf-Reaktionsgefäßen 15 Minuten bei 56°C vorinkubiert. Dabei wurden die Proteinproben sowie die Eichwerte in einem Gesamtvolumen von 1 ml 0,5 N NaOH hydrolysiert. Anschließend wurden die Proben in einer Eppendorf-Laborzentrifuge für Eppendorf-Reaktionsgefäße abzentrifugiert und jeweils 0,95 ml des Überstandes in eine Reagenzglas abpipettiert. Sodann wurden 5 ml eines frisch zubereiteten Gemisches (100 ml 2%ige Natriumbikarbonatlösung in 0,5%iger Kupfer(II)-Sulfatlösung) zugesetzt und die Ansätze geschüttelt. Genau 10 Minuten später erfolgte die Zugabe von jeweils 0,5 ml 1 N Folin-Ciocalteus Reagenz. Exakt 30 Minuten später wurde in einer Küvette bei 700 nm die Extinktion gegen den Leerwert (H_2O) gemessen. Aus der erstellten Eichgeraden wurde die jeweilige Proteinkonzentration der Probe bestimmt.

2.5 Messung der Radioaktivität

Die tritiummarkierten Proben (Fraktionen mit den jeweiligen Metaboliten) wurden in 10 ml des Szintillationsgemisches Lumagel^R (Baker) in einem Flüssigkeitsszintillationsspektrometer (Packard, Modell 3380, Frankfurt/Main) bei 4°C gemessen. Die Impulse pro Minute (cpm) wurden in Zerfälle pro

Minute (dpm) umgerechnet, wobei die jeweilige Zählausbeute Eichkurven mit ^{3}H-Toluol entnommen wurden.

$$dpm = \frac{cpm \times 100}{Zählausbeute}$$

Der hier genannte Rechenvorgang wurde mit einem Tischrechner im 'on-line'-Betrieb (Diehl, Modell Alphatronic, Nürnberg) ausgeführt, wobei der Vorteil in einer automatisch vorgenommenen Quenchkorrektur bestand.

2.6 Statistische Auswertung

Die in der Arbeit aufgeführten Mittelwerte sind in allen Fällen die arithmetischen Mittelwerte. Sie sind zusammen mit der Standardabweichung angegeben.

In einzelnen Fällen wurden die Unterschiede der Mittelwerte auf Signifikanz geprüft. Dies erfolgte nach Student's-t-Test (Gosset (= Student), 1908).

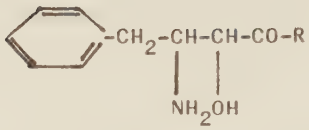
Hemmeffekte wurden prozentual ausgedrückt; diejenige Konzentration, die eine Hemmung von 50% verursachte (IC_{50}-Wert), wurde graphisch mittels Wahrscheinlichkeitspapier ermittelt.

3 Material

Tyrosyl-(^{3}H)-Leucin^{5}-Enkephalin wurde von der Firma New England Nuclear (NEN, Dreieich), sämtliche Aminosäuren, Peptide einschließlich des Leucin-Enkephalins (des unmarkierten) und Bestatin wurden von Sigma Chemicals (Sigma, München) bezogen. Das Tetrapeptid Tyr-Gly-Gly-Phe wurde von der Bachem AG (Bubendorf, Schweiz) hergestellt. Thiorphan war ein Geschenk der Hoffmann-La Roche AG (Basel, Schweiz), während die Firma Heyden (München) den Inhibitor Captopril zur Verfügung stellte. Die Abb.5 zeigt die Inhibitoren Bestatin, Captopril und Thiorphan in ihren Strukturformeln.

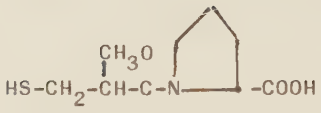
Die Neuroblastomazellen des Stammes N I E 115 waren dankenswerterweise von Prof.U.Littauer (The Weizman Institute of Science, Dept. of Neurobiology, Rehovot; Israel) zur Verfügung gestellt worden.

a) Bestatin (2S,3R)-amino-2hydroxy-4phenylbuttersäure



R = Leucin

b) Captopril D-3mercapto-methylpropanoyl-L Prolin



C) Thiorphan DL-3mercapto-1benzylpropanoyl-Glycin

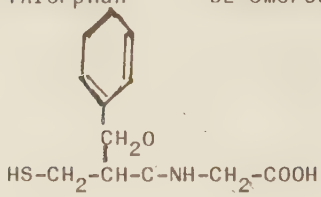


Abb. 5: Struktur der eingesetzten Inhibitoren

4 Ergebnisse

4.1 Beurteilung des HPLC - Verfahrens zur Trennung der tyrosinhaltigen Enkephalinmetabolite

Zur Beurteilung wurden drei Parameter, die sich folgendermaßen erfragen lassen, herangezogen: 1. Gewährleistet das Säulenmaterial und die mobile Phase die wiederholte Trennung der Metabolite mit stabilen Retentionszeiten? 2. Wie hoch ist die Reproduzierbarkeit der jeweiligen Messung? 3. Steigt bei wiederholten Analysen die Untergrundaktivität (unspezifische Radioaktivität) an?

Die Beantwortung der ersten beiden Fragen ergibt sich aus den Daten der Tabelle 1. Danach schwankte die Retentionszeit innerhalb der vier gemessenen Analysen einheitlich für alle Metaboliten um maximal 4 Sekunden. Das ist in sofern von geringer Bedeutung, als die Proben zu den tatsächlichen Retentionszeiten gesammelt wurden und nicht zu fest eingegebenen Zeiten. Andererseits wies die geringe Abweichung der tatsächlichen Retentionszeiten darauf hin, daß das analytische Problem der Trennung der tyrosinhaltigen Metabolite mit der gewählten stationären und mobilen Phase zu lösen war.

Aus den in der Tabelle angegebenen dpm-Werten für die einzelnen Metabolite, ermittelt in vier aufeinanderfolgenden Messungen derselben Probe, geht hervor, daß nicht nur die Retentionszeiten sondern auch die tatsächlich eluierten Metabolitenmengen gut reproduzierbar waren. Bei letzteren lag die Streuung bei ca. 10%, d.h. das HPLC - Verfahren ist mit einem Versuchsfehler von ca. 10% behaftet.

Aus der über die gesamte Zeit von 17 Minuten in 0,5 Minuten - Abständen gesammelten und gemessenen Radioaktivität in dpm bei vier aufeinanderfolgenden Analysen ein- und derselben

Probe ergab sich praktisch kein Anstieg der Untergrundaktivität, wie der Tab.2 zu entnehmen ist. Dies ist aber nur dann gegeben, wenn die Wasch- und Äquilibrierzeiten sowie die Flußgeschwindigkeiten zwischen den einzelnen Analysen exakt eingehalten werden, wie im Methodenteil ausgeführt ist.

Tabelle 1: Eluierte Aktivität und Retentionszeiten bei wiederholter Messung

Metabolit	Retentionszeit	dpm
^{3}H-Tyrosin	4' 00'' ± 0' 4''	15307 ± 1312
^{3}H-Tyr-Gly-Gly	7' 36'' ± 0' 4''	983 ± 95
^{3}H-Tyr-Gly	8' 42'' ± 0' 4''	173 ± 17
^{3}H-Tyr-ly-Gly-Phe	11' 12'' ± 0' 4''	nicht bestimmbar
^{3}H-(Leu^{5})-Enkephalin	15' 40'' ± 0' 4''	365072 ± 36798

Es wurden viermal hintereinander 16 µl ein- und derselben Probe auf die Säule aufgetragen und die Aktivitäten eluiert. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte sowie deren Standardabweichung.

Tabelle 2: Eluierte Aktivität in 4 aufeinander folgenden Analysen ein- und derselben Probe

Fraktionen					
0,0'- 0,5'	29 ±	3	8,5'- 9,0'	138 ±	15
0,5'- 1,0'	24 ±	3	9,0'- 9,5'	104 ±	11
1,0'- 1,5'	8220 ±	820	9,5'- 10,0'	76 ±	8
1,5'- 2,0'	2480 ±	123	10,0'- 10,0'	67 ±	5
2,0'- 2,5'	1056 ±	55	10,5'- 11,0'	105 ±	9
2,5'- 3,0'	468 ±	47	11,0'- 11,5'	780 ±	75
3,0'- 3,5'	5000 ±	380	11,5'- 12,0'	3050 ±	303
3,5'- 4,0'	34445 ±	3500	12,0'- 12,5'	4162 ±	400
4,0'- 4,5'	4472 ±	430	12,5'- 13,0'	2827 ±	281
4,5'- 5,0'	209 ±	22	13,0'- 13,5'	2556 ±	248
5,0'- 5,5'	174 ±	15	13,5'- 14,0'	2160 ±	217
5,5'- 6,0'	147 ±	15	14,0'- 14,5'	3900 ±	348
6,0'- 6,5'	603 ±	58	14,5'- 15,0'	5218 ±	522
6,5'- 7,0'	685 ±	58	15,0'- 15,5'	1747 ±	173
7,0'- 7,5'	338 ±	28	15,5'- 16,0'	14192 ±	142
7,5'- 8,0'	1009 ±	102	16,0'- 16,0'	1212 ±	108
8,0'- 8,5'	598 ±	60	16,5'- 17,0'	2930 ±	280

Es wurden viermal hintereinander 16 µl ein- und derselben Probe auf die Säule aufgetragen, die Aktivitäten eluiert und in 0,5 min Abständen gemessen. Angegeben sind arithmetische Mittelwerte sowie deren Standardabweichung.

4.2 Abbau von $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin durch Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115) (Suspensionen, Rohmembranfraktionen, reine Plasmamembranfraktionen)

Zunächst sollte geprüft werden, ob Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115) Enkephalin enzymatisch inaktivieren können.

Deshalb wurden mit der Zellsuspension Inkubationsversuche zur Temperatur und Zeitabhängigkeit durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin (140 nM) bei 0^{o} C und bei 37^{o} über verschiedene Zeiten inkubiert.

Während der enzymatische Abbau bei 0^{o} C praktisch vollständig ruhte, war eine Inaktivierung bei 37^{o} C deutlich meßbar (Abb.6). Nach 15 Minuten waren 60% des eingesetzten Enkephalins abgebaut.

Um mehr Informationen über die Art der enzymatischen Inaktivierung zu erhalten, wurden neben der Messung der reinen Enkephalinabnahme während des Inkubationsvorgangs die einzelnen Metabolite analysiert. Dabei wurden Tyrosin, das Dipeptid Tyr-Gly und das Tripeptid Tyr-Gly-Gly erkannt. Abb.7a zeigt die Metaboliten im Inkubationsansatz nach 2,5 Minuten Inkubationszeit bei 37^{o} C ausgedrückt in pMol pro mg eingesetztes Protein. Es zeigte sich ein sehr geringes Niveau der Metabolite Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly verglichen mit dem Hauptmetaboliten Tyrosin. 20% des eingesetzten Enkephalins (140 nM) waren nach 2,5 Minuten gspalten, wobei 91,3% zu Tyrosin metabolisiert wurde, während der Anteil von Tyr-Gly-Gly nur 1,5%, der von Tyr-Gly lediglich 7,2% entsprach. Von der Annahme ausgehend, daß am Enkephalinabbau beteiligte Peptidasen im synaptischen Spalt membrangebunden sind, wurden die Experimente mit einer Rohmembranfraktion wiederholt. Dabei konnten höhere Metabolitenkonzentrationen pro mg Pro-

tein (= spezifische Aktivitäten) erwartet werden, sofern an deren Bildung membranständige Enzyme beteiligt sind.

Es konnten wieder Tyrosin, Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly nachgewiesen werden (Abb.7b). Verglichen mit den Resultaten in Abb.7a (Zellen in Suspension) waren die Konzentrationen von Tyrosin und Tyr-Gly deutlich vermindert. Dagegen kam es zu einem Anstieg der Tripeptidkonzentration auf das 5-fache. Vom eingesetzten Enkephalin wurden unter diesen Bedingungen 66% zu Tyrosin, 30% zu Tyr-Gly-Gly metabolisiert. Die Ergebnisse deuten auf eine membranständige Lokalisation des oder der Tripeptid-bildenden Enzyme hin.

Um der Frage nachzugehen, ob die Steigerung der spezifischen Aktivität der Tripeptidbildung bei der Rohmembranfraktion lediglich Produkt einer lysosomalen oder mitochondralen Kontamination der Rohmembranfraktion ist, wurden die Experimente mit reinen Plasmamembranen wiederholt. Von diesen wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen angefertigt, die die Freiheit der reinen Plasmamembranfraktion von lysosomaler und mitochondraler Kontamination beweisen. Abb.8 zeigt Beispiele solcher Aufnahmen. Die Inkubationsexperimente wurden bei 25^{o} C über 6 Minuten durchgeführt. Vom eingesetzten Enkephalin wurden unter diesen Bedingungen 80% zu Tyrosin, 17% zu Tyr-Gly-Gly und 3% zu Tyr-Gly metabolisiert. Unter Berücksichtigung des Meßfehlers entsprechen sich die Ergebnisse von reinen Plasmamembranen und Rohmembranfraktion qualitativ. Abb.9 stellt die genauen Ergebnisse dar.

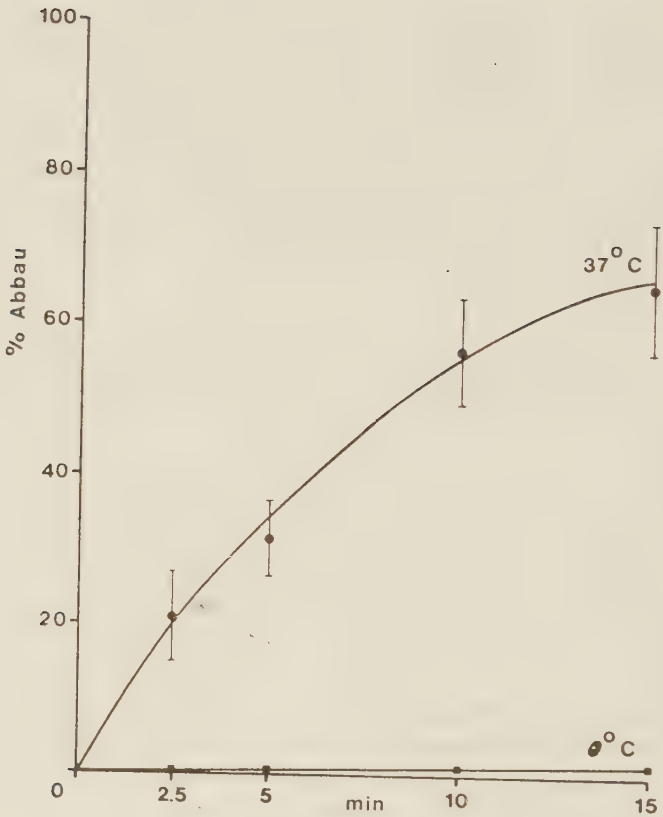


Abb.6: Zeitverlauf des $^{3}H(Leu^{5})$enkephalinabbaus bei 0°C und 37°C 40 µl der Zellsuspension (1 µg Eiweiß/1 µl wurden bei 0°C und 37°C in 100 µl KRT-Puffer (pH 7,4) mit 140 nM $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin inkubiert. Mittelwerte der N 1 E 115 Experimente und deren Standardabweichungen (n=3).

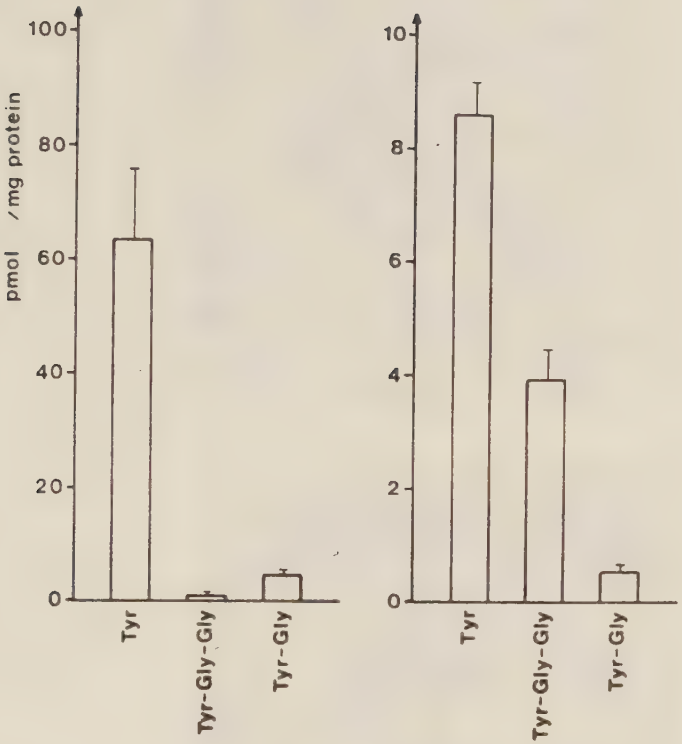


Abb.7: Bildung von Tyr, Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly während des $^{3}H(Leu^{5})$enkephalinabbaus bei 37°C in einer Zellsuspension a) und in einer Rohmembranfraktion b) von Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115).
40 µl Suspension (1 µg Eiweiß/1 µl) wurden bei 37°C in 100 µl KRT-Puffer (pH 7,4) mit 140 nM $^{3}H(Leu^{5})$-enkephalin 2,5 min inkubiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Experimenten.

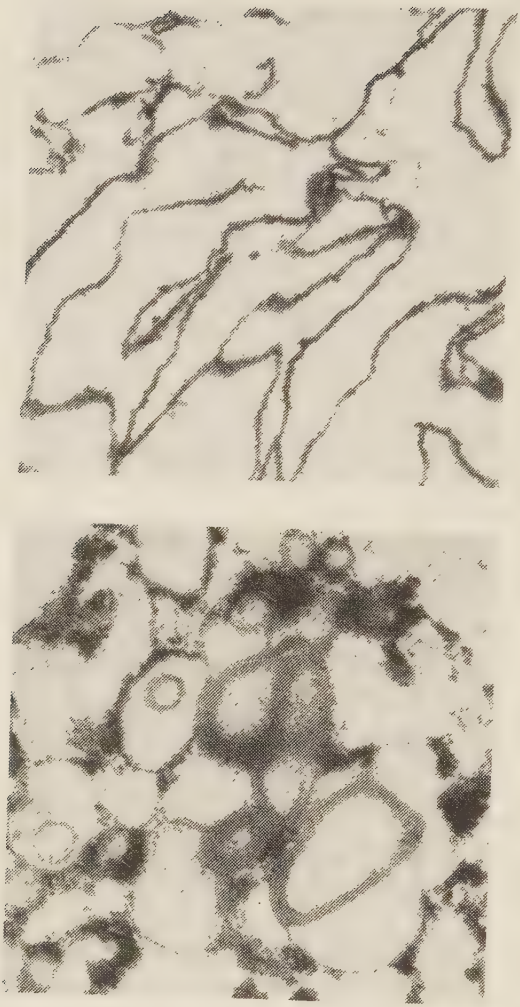
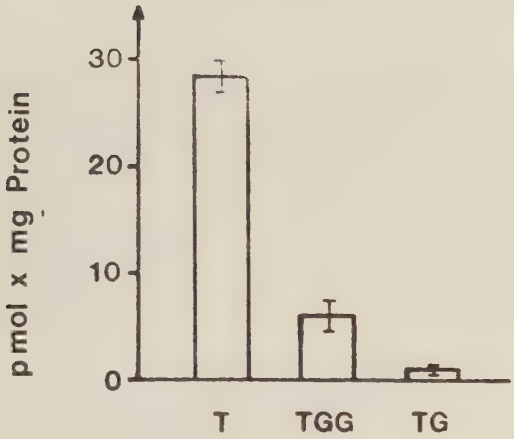


Abb.8: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von Plasmamembranen Neuroblastomazellen (N 1 E 115). Fixierung mit 2% Glutardialdehyd, 1% Tannin, Postfixierung mit OsO_4, UrAc, Kontrastierung mit UrAc und Pb-Citrat. Vergrößerung ca. 96.000-fach.



T Tyr
TGG Tyr-Gly-Gly
TG Tyr-Gly

Abb.9.: Bildung von Tyr, Tyr-Gly-Gly- und Tyr-Gly während des Enkephalinabbaus durch reine Plasmamembranen von Neuroblastomazellen (N 1 E 115) bei 25°C. Inkubationsbedingungen wie unter Abb.7. Mittelwerte und Standardabweichungen aus 4 Experimenten.

Legenden zu den Abbildungen 10 und 11:

Abb.10: Einfluß von Bestatin auf die Bildung Tyr-haltiger Metabolite durch Rohmembranen von Neuroblastomazellen (N 1 E 115).
Die Rohmembranen wurden mit Bestatin vorinkubiert (15 min, 25°C) und dann 6 min bei 25°C mit 140 nM $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin in 100 µl KRT-Puffer (pH 7,4) inkubiert. Mittelwerte und deren Standardabweichungen aus 5 Experimenten. $^{+}$ $p < 0,1$: $^{++}$ $p < 0,05$ gegenüber der Kontrolle.

Abb.11.: Wirkung von Captopril und Thiorphan auf die Tyr-Gly-Gly-Bildung durch Rohmembranen von Neuroblastomazellen (N 1 E 115). Die Membranen wurden mit den Substanzen 15 min vorinkubiert, dann für 2,5 min bei 37°C mit $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin inkubiert. Bedingungen wie unter Abb.7. Die obere Dosis-Wirkungskurve zeigt den Effekt von Captopril (■) (IC_{5} = 2,7 nM), die untere den von Thiorphan (○) (IC_{50} = 63 nM). Der obere rechte Einschub zeigt den Effekt von 100 nM Thiorphan, 100 nM Captopril und beiden Substanzen zusammen auf die Tripeptidbildung. Mittelwerte aus 4 Experimenten und deren Standardabweichungen.

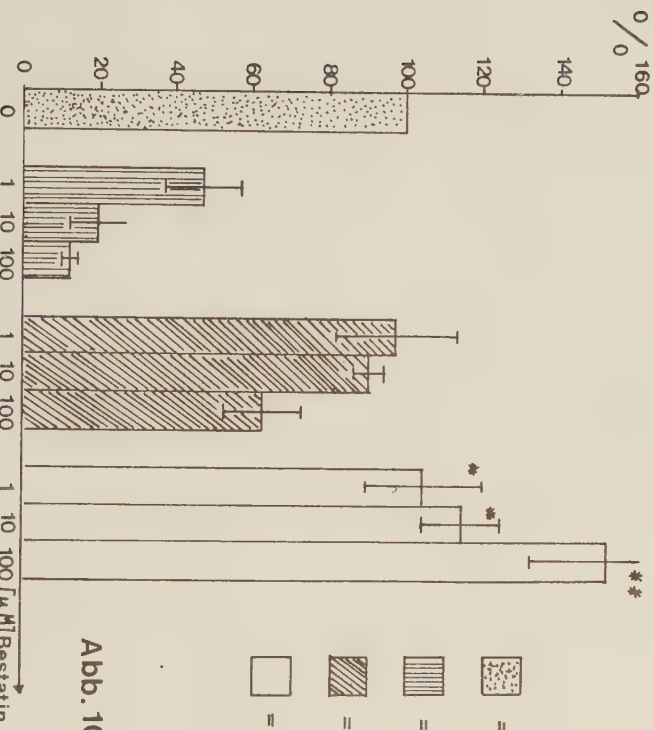

%
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0
1
10
100
1
10
100
1
10
100
[µM] Bestatin
**
*
*
= KONTROLLE
= TYR-Bildung
= TYR-GLY-GLY-Bildung
= TYR-GLY-Bildung

Abb. 10

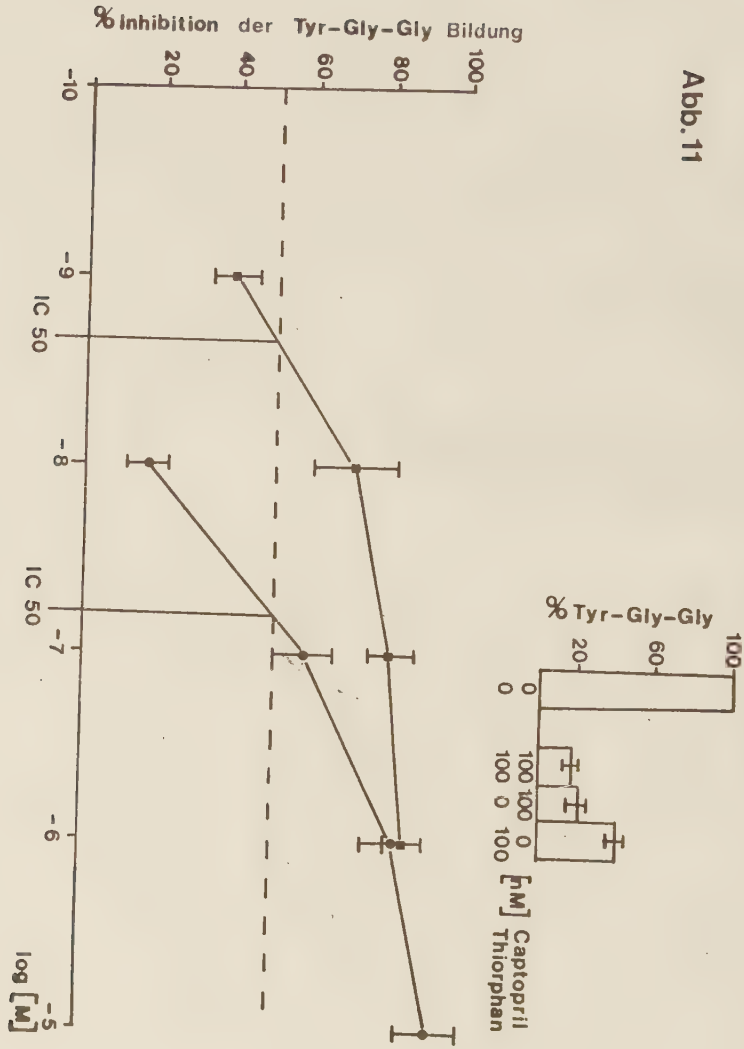

% Inhibition der Tyr-Gly-Gly Bildung
20
40
60
80
100
-10
-9
-8
-7
-6
-5
log [M]
IC 50
IC 50
% Tyr-Gly-Gly
20
60
100
0
0
100
100
100
0
100
0
[nM] Captopril
Thiorphan

Abb. 11

4.2.1 Wirkung von Bestatin, Captopril und Thiorphan auf den $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin-Abbau durch Membranen von Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115)

Der Aminopeptidasehemmstoff Bestatin zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tyrosinbildung, während die Tripeptidbildung nahezu unbeeinflußt blieb. Nur die eingesetzte höchste Konzentration von 10^{-4} M vermochte die Try-Gly-Gly-Produktion um ca. 40% zu reduzieren, während die Tyr-Gly-Bildung in Gegenwart von Bestatin statistisch signifikant ($p < 0,05$) (siehe Abb.10).

Die Tripeptidbildung könnte auf der Aktivität von Dipeptidylcarboxypeptidasen beruhen, von denen das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) und die Enkepahlinase A als mögliche Enzyme in Betracht gezogen wurden. Es wurde deshalb der Angiotensin-converting enzyme Inhibitor Captopril und der vermeintlich selektive Hemmstoff der Enkephalinase A, Thiorphan, bezüglich ihrer möglichen Beeinflußung der Tyr-Gly-Gly-Bildung während des Enkephalinabbaus untersucht.

Beide Substanzen konnten die Tripeptidbildung erheblich reduzieren (siehe Abb.11). Die IC_{50} für Captopril betrug $2,69 \times 10^{-9}$M, diejenige für den Enkephalinase A Hemmstoff Thiorphan lag um den Faktor 25 höher ($6,31 \times 10^{-8}$M). Beide Inhibitoren zeigten keinen Effekt auf die Tyrosin- oder Tyr-Gly-Produktion. Wurden die Rohmembranen mit Captopril zusammen mit Thiorphan (je 100 nM) inkubiert, zeigte sich lediglich eine 80%ige Hemmung der Tripeptidbildung, wie sie auch von Captopril allein bewirkt wurde (siehe Abb.11, oben rechts). Eine additive Wirkung beider Substanzen war somit nicht vorhanden.

Diese Befunde legen die Vermutung nahe, daß die wichtigsten Enzyme des Enkephalinmetabolismus auf der Plasmamembran

lokalisiert sind. Es handelt sich hierbei um Bestatin-empfindliche Aminopeptidase(n) und sehr wahrscheinlich um das Angiotensin-converting enzyme (ACE), wie die Experimente mit Captopril schließen ließen. Aus dem Hemmeffekt, der durch Thiorphan ausgelöst wurde, wurde nicht die Beteiligung einer zweiten Dipeptidylcarboxypeptidase (Enkephalinase A) angenommen, wohl aber eine mögliche Hemmung des Angiotensin-converting enzymes durch diese Substanz.

Die genannten Hemmstoffe sind mir ihren Strukturformeln in Abbildung 5 dargestellt.

4.3 Abbau von ^{3}H(Leu^{5})enkephalin durch primäre Astrocyten (Suspensionen, Rohmembranfraktionen, reine Plasmamembranfraktionen)

Von Interesse war nun, zu untersuchen, ob auch Gliazellen Enkephalin metabolisieren können. So wurden auch in diesem Falle Inkubationsversuche zur Temperatur- und Zeitabhängigkeit mit einer Suspension primärer Astrocyten aus den Gehirnen 2 Tage alter Ratten durchgeführt. Dazu wurden die Zellen mit ^{3}H(Leu^{5})enkephalin (140 nM) bei 0°C und 25°C über verschiedene Zeiten inkubiert.

Bei 25°C wurden 50% des eingesetzten Enkephalins innerhalb von 15 Minuten abgebaut, wohingegen bei 0°C praktisch keine Metabolisierung stattfand (siehe Abb.12).

Die Analyse der Reaktionsprodukte mit der HPLC ergab als Metabolite Tyrosin, Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly.

Die Abbildung 13 stellt die Bildung dieser Enkephalinspaltprodukte in Abhängigkeit von der Zeit bei 25°C dar. Hauptmetabolit war Tyrosin, während Tri- und Dipeptid nur in sehr

geringen Mengen gebildet wurden. So entfielen beispielsweise nach 6 Minuten, als ca. 30% des Substrats metabolisiert waren, 77% auf Tyrosin, 15% auf Tyr-Gly-Gly und 8% auf Tyr-Gly.

Wie bei den N 1 E 115 Neuroblastomazellen wurde auch bei den primären Astrocyten der Frage nach der Membranständigkeit der enkephalinspaltenden Peptidasen nachgegangen. Es wurde wieder der Verlauf der Metabolitenbildung bei 25°C über die Zeit verfolgt, wobei jetzt eine Rohmembranfraktion verwendet wurde.

Es zeigte sich, verglichen mit den Experimenten an intakten Zellen in Suspension im Falle der Membranen, ein deutliches Abnehmen der Tyrosin- und Tyr-Gly-Bildung, während die Tyr-Gly-Gly-Bildung doppelt so hoch war.

Analog zu dem Vorgehen bei den N 1 E 115 Neuroblastomazellen wurden die Experimente der Rohmembranfraktion mit einer reinen Plasmamembranfraktion verglichen (siehe Abb.14). Durch elektronenmikroskopische Aufnahmen war gezeigt worden, daß die verwendete reine Plasmamembranfraktion frei von lysosomalen oder mitochondralen Kontaminationen war. Die Abbildung 15 zeigt exemplarisch elektronenoptische Aufnahmen. Die spezifischen Aktivitäten der Tyr-Gly-Gly-Bildung an Rohmembran- und reiner Plasmamembranfraktion stimmten überein.

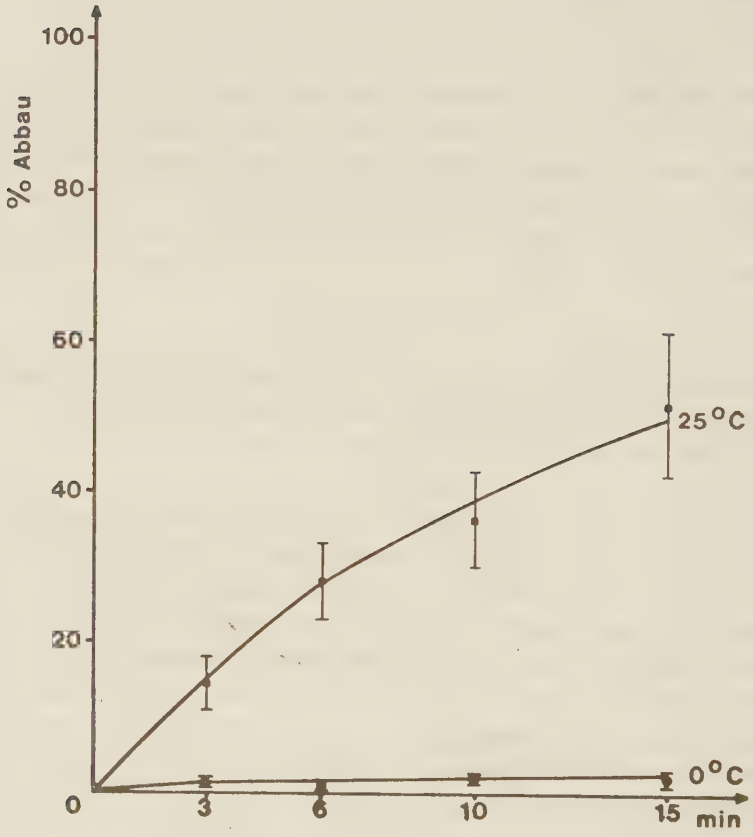


Abb.12: Zeitverlauf des Enkephalinabbaus bei 0°C und 25°C bei primären Astrocyten. 40 µl der Zellsuspensionen (1 µg Eiweiß/1 µl) wurden bei 0°C und 25°C in 100 µl KRT-Puffer (pH 7,4) mit 140 nM $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin inkubiert. Mittelwerte aus 5 Experimenten mit deren Standardabweichungen.

Abb.13: Zeitverlauf der Bildung von Tyr, Tyr-Gly und Tyr-Gly-Gly während des Enkephalinabbaus durch primäre Astrocyten bei 25°C. Die Inkubation wurde mit einer Zellsuspension (---) und mit einer Rohmembransuspension (——) unter den gleichen Inkubationsbedingungen wie für Abb.12 durchgeführt. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 5 Experimenten.

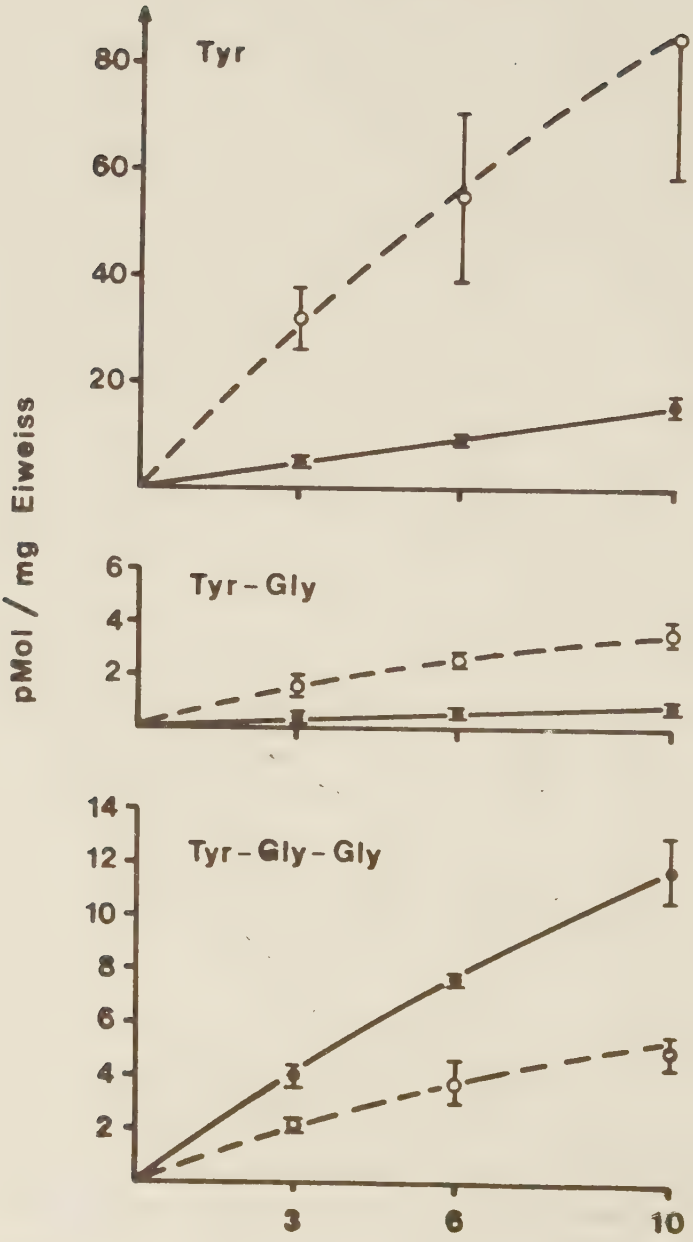

Tyr
80
60
40
20
pMol / mg Eiweiss
Tyr-Gly
6
4
2
Tyr-Gly-Gly
14
12
10
8
6
4
2
3
6
10
min

Abb. 13

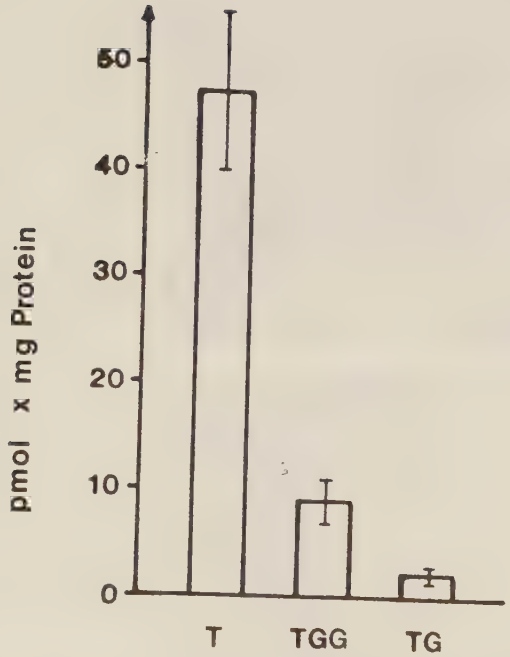


Abb.14: Bildung von Tyr, Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly während des Enkephalinabbaus durch reine Plasmamembranen primärer Astrocyten bei 25°C. Inkubationsbedingungen wie unter Abb.7. Mittelwerte mit Standardabweichungen aus 4 Experimenten.

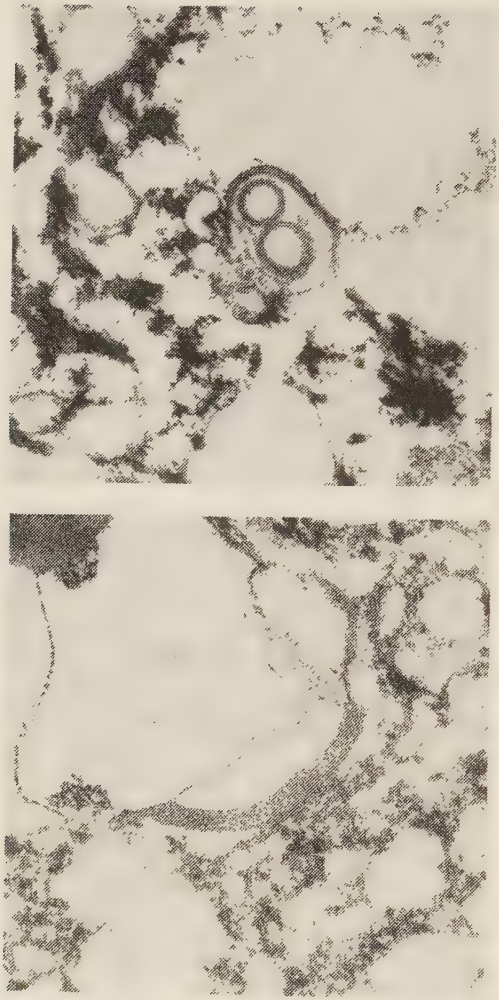


Abb.15: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von Plasmamembranen primärer Astrocyten.
Fixierung mi 2% Glutardialdehyd, 1% Tannin, Postfixierung mit OsO_4, UrAc, Kontrastierung mit UrAc und Pb-Citrat. Vergrößerung ca. 96.000-fach.

4.3.1 Wirkung von Bestatin, Captopril und Thiorphan auf den $^{3}H(Leu^{5})$enkephalinabbau durch Rohmembranen von primären Astrocyten

Die Wahl der Substanzen erfolgte aus denselben Gründen, wie sie bei der Beschreibung der Neuroblastomazellexperimente genannt wurden. Mit ihren Effekten sollte eine erste Charakterisierung der beteiligten Abbauenzyme versucht werden.

Bestatin zeigte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Tyrosinbildung, wobei lediglich in der höchsten Konzentration von 10^{-4}M die Tripeptidproduktion gehemmt wurde. Unter Bestatin kam es zumindest tendenziell zu einem schwachen Anstieg der Dipeptidspiegel, der jedoch statistisch nicht signifikant war.

Captopril in Konzentrationen von bis zu 10 µM war in allen Fällen unwirksam. Thiorphan dagegen zeigte eine sehr starke Hemmung der Tyr-Gly-Gly-Bildung, ohne Einfluß auf die anderen Metabolisierungsreaktionen zu haben (siehe Abb.16). Die aus diesen Experimenten errechnete IC_{50} für Thiorphan betrug $2,5 \times 10^{-9}$M bezüglich der Hemmung der Tripeptidbildung.

Wie bei den Neuroblastomazellen waren die wichtigsten Enzyme des Enkephalinmetabolismus bei Gliazellen auf deren Plasmamembran lokalisiert. Es handelte sich dabei um eine oder mehrere Bestatin-empfindliche Aminopeptidasen und um die Enkephalinase A, wie der überaus starke Hemmeffekt des Thiorphans und die Unwirksamkeit des Captopril nahelegten.

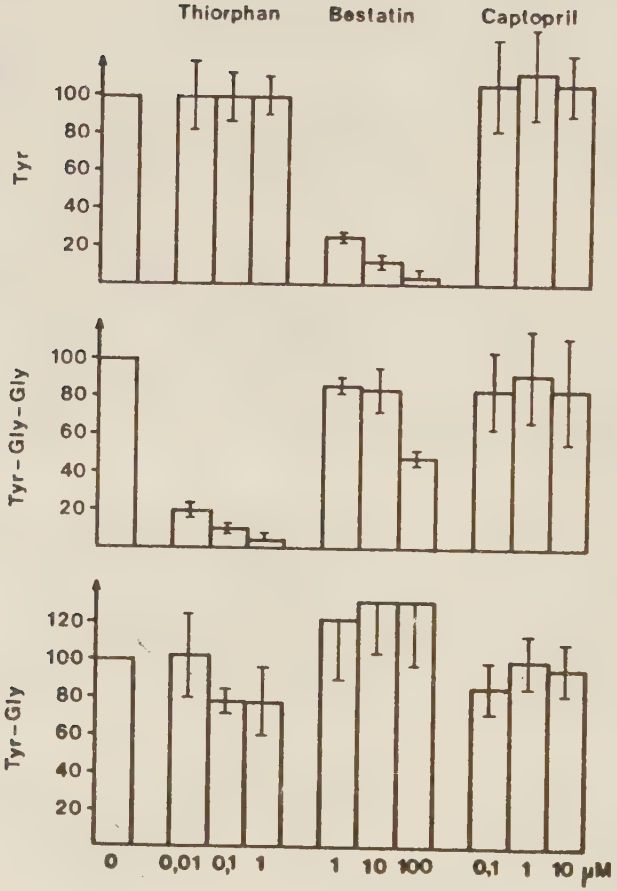


Abb.16: Einfluß der Inhibitoren Thiorphan, Bestatin und Captopril auf die Bildung von Tyr, Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly durch Rohmembranen primärer Astrocyten. Die Membranen wurden mit den Substanzen 15 min vorinkubiert, dann für 6 min bei 25°C mit $^{3}H(Leu^{5})$enkephalin inkubiert. Bedingungen wie unter Abb.7.

5 Diskussion

Im Hinblick auf die entwickelte analytische Methodik zeigt diese Untersuchung eine klare und eindeutige Trennung der Pentapeptide Leucin-Enkephalin bzw. das in dieser Studie nicht verwendete Methionin-Enkephalin, das selbst eine kürzere Retentionszeit hat, von allen tyrosinhaltigen Metaboliten. In Anwendung des Prinzips der Ionenaustauschchromatographie zeigt die entwickelte HPLC-Methode die Trennung der Hauptmetabolite des Enkephalinabbaus Tyrosin, Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly mit einem einzigen isokratischen System. Die besondere Bedeutung liegt in der Trennung der Metabolite Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly, die erst durch Anwendung des Ionenaustauschers ermöglicht wurde. Gegenüber der am häufigsten verwendeten dünnschichtchromatographischen Methode besteht der Vorzug zum einen in der schon erwähnten sicheren und deutlichen Trennung von Tyr-Gly-Gly und Tyr-Gly, was besonders für die hier verfolgte Fragestellung von erheblicher Bedeutung war, und zum anderen in der deutlich höheren Aktivitätsausbeute der HPLC-Analytik, da bei letzterer die radioaktivmarkierten Metabolite und das markierte Substrat bereits in der wässrigen Phase vorliegen. Als Nachteile der Dünnschichtchromatographie sollen die größere Umständlichkeit, der größere Zeitaufwand und die größere Gefahr des Substanzverlustes beim Auskratzen der Substanzflecken der Vollständigkeit halber erwähnt werden. Mit der hier beschriebenen Methode steht neben einer Ligandenaustauschchromatographie (Guyon et al., 1979) eine zweite HPLC-Methode zur Trennung der Enkephalinmetabolite zur Verfügung.

Obwohl seit längerem bekannt ist, daß die Pentapeptide Met-Enkephalin und Leu-Enkephalin eine Neurotransmitter- bzw. Neuromodulatorfunktion im Zentralnervensystem (ZNS) haben, ist wenig über den Mechanismus der peptidergen Neurotransmission bekannt. Um die Rolle der Neuropeptide bei diesem

Vorgang richtig verstehen zu können, ist es sinnvoll, Vergleiche zu den klassischen Neurotransmittern anzustellen. Ein wichtiger Aspekt bei der Neurotransmission ist die Beendigung der Transmitterwirkung. Bei den klassischen Überträgerstoffen wie Acetylcholin oder Noradrenalin wird ihre Wirkung durch inaktivierende Enzyme und/oder durch aktive Wiederaufnahme der Substanz in das Nervenende beendet. Die Enzyme, die für die Inaktivierung verantwortlich sind, müssen dazu im Bereich der Synapse lokalisiert sein.

In Analogie dazu gibt es auch Enkephalin-inaktivierende Peptidasen im Bereich der Synapsen. Doch herrscht weitgehende Unklarheit über die Bedeutung der einzelnen Peptidasen am Gesamtabbau des freigesetzten Enkephalins. Ferner ist nicht zuverlässig geklärt, wo die Enzyme auf subzellulärer Ebene lokalisiert sind. Wenn man davon ausgeht, daß im Bereich von Synapsen des ZNS auch zahlreiche Gliazellen vorkommen, so ist auch der Frage nachzugehen, ob für die Metabolisierung der Enkephaline Nerven- und Gliazellen in Betracht kommen.

Kurz nach der Entdeckung der Enkephaline durch Hughes et al. (1975) beobachtete Hughes (1975), daß Enkephaline in biologischen Systemen schnell inaktiviert werden. Proteolytische Enzyme des Blutes oder auch des Gehirns sind dafür verantwortlich (Jacquet et al., 1976; Hambrook et al., 1976), worauf auch die überaus kurzdauernde physiologische Aktivität der Pentapeptide zurückgeführt wird.

Wird ein nicht näher definiertes Rattenhirnhomogenat mit 100 nM ^{3}H-Leu-Enkephalin bei 37°C inkubiert, so ist das Substrat innerhalb von 1 Minute völlig abgebaut. Hambrook und Mitarbeiter (1976), die diese Befunde erhoben haben, wiesen die Spaltung der Tyr-Gly-Bindung als initialen und Hauptmetabolisierungsschritt nach. Das benutzte Rattenhirnhomogenat enthält sowohl lösliche als auch partikuläre En-

zyme. Lane et al. (1977) untersuchten schon sehr früh die subzelluläre Lokalisation der Leu-Enkephalin hydrolysierenden Aktivität im Rattenhirnhomogenat und konnten die Hauptpeptidaseaktivität in Überständen (lösliche Fraktionen) nachweisen. Nach Entfernen des löslichen Anteils wurde die Aktivität in einer Synaptosomenfraktion ermittelt: Bei Inkubation dieser Synaptosomen mit 100 µM ^{3}H(Leu)enkephalin bei 37°C wurden 7,8 nMol Enkephalin pro Minute pro mg Eiweiß hydrolysiert, das sind 15,5% des eingesetzten Substrates. Nach besonderer Reinigung der Synaptosomen betrug die Hydrolyserate unter gleichen Bedingungen noch 5,2%.

Der Abbau erfolgt also in erhelbich geringerem Maße, wenn lösliche proteolytische Enzyme fehlen. Die überaus kurze Halbwertszeit für Enkephaline, die zwischen 1 und 4 min im Gehirn liegt, ist wohl in erster Linie auf lösliche Enzyme zurückzuführen, woher diese auch immer stammen mögen.

Ausgehend von der These, daß die in die Beendigung der Transmitterwirkung involvierten Enzyme analog der Acetylcholinesterase membranlokalisiert sind, läßt diese Studie die löslichen Peptidasen außer Betracht und beschränkt sich auf die Untersuchung partikulärer Enzyme.

Synaptosomale Membranen aus Maus- und Rattengehirnen, mehr oder weniger aufgereinigt und unterschiedlich präpariert, enthalten als Hauptinaktivierungsaktivität für Enkephaline die Tyr-Gly-Bindung spaltende Peptidaseaktivität (Craves et al., 1978; Malfroy et al., 1978). Diese ist, wie Knight und Klee (1978) erstmalig zeigen konnten, einer oder mehreren membrangebundenen Aminopeptidasen zuzuordnen.

Außerdem wurden in Synaptosomen Dipeptidylaminopeptidasen, die die Gly-Gly-Bindung zu spalten vermögen und das Dipeptid Tyr-Gly dabei freisetzen, nachgewiesen. Diese Enzyme schei-

nen von untergeordneter Bedeutung bzgl. des Enkephalinabbaus zu sein. Eine von ihnen ist das von Gorenstein und Snyder (1979) Enkephalinase B benannte, mit p-Chloromercuribenzoat hemmbare Enzym. Einige Jahre später wurde von Hazato et al. (1982) aus Gehirnen von Affen ein durch 1,10-Phenanthrolin hemmbares Enzym isoliert, das wohl identisch mit dem von Gorenstein und Snyder (1979) beschriebenen ist.

Das Tripetid Tyr-Gly-Gly ist das Reaktionsprodukt der von den Gruppen um Malfroy et al. (1978) und Sullivan et al. (1978) erstmals beschriebenen und benannten Enkephalinase A. Tyr-Gly-Gly ist jedoch auch das Reaktionsprodukt der Reaktion des Angiotensin I - converting enzyme (ACE) (EC 3.4.15.1, Kininase II) (Erdös et al., 1978). Daß es sich bei der Enkephalinase A und dem Angiotensin - converting enzyme keinesfalls um ein und dasselbe Enzym handelt, ist von vielen Arbeitsgruppen unabhängig voneinander beschrieben worden (Arregui et al., 1979; Gorenstein und Snyder, 1979; Swerts et al., 1979). Die Enkephalinase A schien sich zunächst durch einen allerdings zwischenzeitlich um den Faktor größer 100 nach oben korrigierten K_M-Wert von 40 nM auszuzeichnen (Malfroy et al., 1978). Außerdem schien die Langzeitbehandlung der verwendeten Mäuse mit Morphin eine Erhöhung der Enzymaktivität um 60% zu erbringen. Unabhängig voneinander konnten jedoch Gorenstein und Snyder (1979) und Swerts et al. (1979) nur eine 20%ige Steigerung der Enkephalinase A-Aktivität finden. Ebenfalls einhellig korrigierten sie den K_M-Wert um den Faktor 100 nach oben. Die Enkephalinase A wird in nanomolaren Konzentrationen durch Thiorphan gehemmt (Roques et al., 1980), während in diesen Konzentrationen ein deutlich geringerer Effekt auf das Angiotensin I - converting enzyme (EC 3.4.15.1., Kininase II) resultiert. Ein weiterer relativ spezifischer Hemmstoff ist das Phosphoramidon. Das Angiotensin I - converting enzyme, dessen Präsenz in den Terminals striatonigraler, Opiatrezeptoren

tragender Neurone (Llorens-Cortes et al., 1979) gezeigt werden konnte, ist bereits in minimalen Konzentrationen durch Captopril (SQ 14.225) inhibiert. Beide Enzyme gehören zu den Dipeptidylcarboxypeptidasen bzw. Endopeptidasen, die die Enkephaline vom C-terminalen Ende her inaktivieren.

Die vierte Abbauweg wird durch Carboxypeptidasen wie die Carboxypeptidase A katalysiert, jedoch ist eine physiologische Relevanz für diesen bisher nicht gezeigt. Tabelle 3 faßt die wichtigsten Daten der Abbauwege sowie die Möglichkeit ihrer Hemmung nochmals zusammen.

Die Auswahl des Neuroblastomazell-Klon N 1 E 115 als neuronales Modell erfolgte deshalb, weil diese Zellen sowohl über Enkephalinrezeptoren, das sind Opiodrezeptoren vom Typ delta, als auch über endogenes Leucin- und Methionin-Enkephalin verfügen (Knodel und Richelson, 1980).

Diese Neuroblastomazellen in Suspension gebracht können temperatur- und zeitabhängig Leu-Enkephalin abbauen. Nach 15 Minuten bei 25°C sind etwa 50% des eingesetzten Enkephalins metabolisiert. Bei 0°C kommt es, wie zu erwarten war, zu praktisch keiner Enkephalinspaltung.

Vergleicht man dieser Ergebnisse mit den vorher genannten Resultaten von Lane et al. (1977), dann fällt auf, daß der prozentuale Anteil an metabolisiertem Enkephalin in der gereinigten Synaptosomenfraktion des Rattenhirnhomogenates und in dem hier eingesetzten Zellmodell etwa gleich groß ist. Allerdings wurden diese Experimente bei 25°C durchgeführt, weshalb die Hydrolyserate bei 37°C geringfügig höher liegen dürfte.

Tab.3:

Enkephalinabbauende Enzymaktivitäten

	Enzyme	Tyr-haltiger Metabolit	Inhibitoren
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Aminopeptidasen	Tyrosin	Bestatin, Puromycin
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Dipeptidylaminopeptidasen	Tyr-Gly	p-Chloromercuri-benzoat (= pHMB), o-Phenanthrolin
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Dipeptidylcarboxypeptidasen a) Enkephalinase A	Tyr-Gly-Gly	Thiorphan, Phosphoramidon
	b) Angiotensin I-converting enzyme		Captopril
Tyr-Gly-Gly-Phe-Leu	Carboxypeptidase A	Tyr-Gly-Gly-Phe	

Die unter diesen Bedingungen beobachtete Enkephalinhydrolyse erbrachte Tyrosin als den hauptsächlichen Metaboliten. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen von Hazum et al. (1979) an ebenfalls opiatrezeptortragenden N 4 TG 1 - Neuroblastomazellen, an denen allerdings lediglich Tyrosin als tyrosinhaltiger Metabolit gefunden wurde. Bei Verwendung sogenannter "crude membranes", die aus den N 1 E 115 Kulturen hergestellt worden waren, zeigte sich ein deutlicher Abfall der der Tyrosin-Produktion entsprechenden spezifischen Enzymaktivität, also der Aminopeptidaseaktivität. Dies könnte durch ein Ablösen der Aminopeptidaseaktivität, aus ihrer vermuteten Membranassoziation während der Membranpräparation bedingt sein. Andererseits könnten die deutlichen Unterschiede zwischen intakten Zellen und Rohmembranen (gleiches gilt für die reinen Plasmamembranen) auch durch eine Freisetzung von Aminopeptidaseaktivität etwa cytosolischer Natur aus dem Zellinneren bedingt sein. Trypanblaufärbungen zeigten, daß nur 50% der Zellen wirklich intakt waren.

Um Charakteristika der beteiligten Enzyme herauszufinden, um sie ferner ganz bestimmten Klassen von Peptidasen zuordnen zu können, bietet sich als ein Weg der Einsatz von Inhibitoren an. Dabei tritt das Problem der Selektivität einzelner Verbindungen in den Vordergrund.

Wagner und Dixon (1981) testeten 8 Proteasehemmstoffe mikrobieller Herkunft und fanden, daß Bestatin ein potenter Inhibitor einer im Rattenhirn vorkommenden löslichen Aminopeptidase ist. Hudgin und Mitarbeiter (1981) konnten eine membranassoziierte Aminopeptidase in Synaptosomen durch Bestatin (= (3R,2S)-3-amino-2-hydroxy-4-phenylbutanoyl-5-Leucin) hemmen. In ihren publizierten Ergebnissen wird für die Hemmung eine IC_{50} von 210 nM angegeben. Der Hemmeffekt des Bestatins auf die Tyrosin-Bildung in den vorliegenden Expe-

rimenten legt es nahe, daß die Tyrosin-Produktion das Resultat einer Aminopeptidasereaktion ist.

In Hinblick auf die Tyr-Gly-Bildung durch N 1 E 115-Zellen kann lediglich bemerkt werden, daß sie möglicherweise membranassoziiert verläuft, keinesfalls jedoch durch membrangebundene Enzyme katalysiert wird.

Das spezielle Augenmerk dieser Studie galt der Tyr-Gly-Gly-Bildung, nachdem einem tripeptidbildenden Enzym der sehr gewichtige Name Enkephalinase A schon relativ früh zugeschrieben wurde. Über die Korrektheit solchen Vorgehens bleibt die Meinung, wie der Verfasser meint, zurecht geteilt.

Als erste Feststellung bezüglich der Tyr-Gly-Gly-Produktion kann gesagt werden, daß die vorliegenden Experimente eine Plasmamembranbindung an N 1 E 115-Zellen belegen. Die spezifische Aktivität ist in der Membranfraktion fünffach höher als in den Zellsuspensionen. Thiorphan reduzierte die Gesamttripeptidbildung in einem Konzentrationsbereich von 10^{-8} bis 10^{-5}M (IC_{50} = 6,3 x 10^{-8}M), während die Tyrosin- und Tyr-Gly-Spiegel unbeeinflußt blieben. Der IC_{50}-Wert ist weit höher als der von Roques et al. (1980) für die Enkephalinase A aus einer Mausstriatum-Membranpräparation ermittelte Ki von 4,7 x 10^{-9}M. Dagegen zeigte sich eine hohe Sensitivität der Tyr-Gly-Gly-Bildung gegenüber dem ACE-Inhibitor Captopril (SQ 14.225). Der Rückgang der Tripeptid-Produktion ist schon ausgeprägt zu nennen und drückt sich in einem IC_{50}-Wert von 2,7 x 10^{-9}M aus. Dieser Wert steht in Einklang mit den Ergebnissen von Swerts et al. (1979), der einen IC_{50}-Wert für Captopril an ACE von 1,6 x 10^{-8}M und für die Enkephalinase A von 1,0 x 10^{-5}M gemessen hatte.

Für die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen ist somit in etwas vereinfachter Form festzuhalten:
Bestatin hemmt die plasmamembranständige Aminopeptidaseaktivität,
Thiorphan hemmt in niedrigeren Konzentrationen die Enkephalinase A, in etwa 16fach höherer Konzentration das ACE,
Captopril hemmt in niedrigen Konzentrationen das ACE, in Konzentrationen höher als 1 µM die Enkephalinase A.

Mit anderen Worten: Der Wert der Hemmstoffe Thiorphan und Captopril für die Differenzierung der beiden Dipeptidylcarboxypeptidasen Enkephalinase A und Angiotensin I - converting enzyme besteht vor allem in der Tatsache, daß Captopril zwar in geringen Konzentrationen auf das ACE stark inhibierend wirkt, die Enkephalinase A aber unbeeinflußt läßt, während Thiorphan erst in mehr als zehnfach höheren Konzentrationen als jene, die die Enkephalinase A hemmen, auf das ACE wirkt.

Da die Beobachtungen an N 1 E 115 Neuroblastomazellen lediglich eine hohe Sensitivität gegenüber Captopril ergaben, ist davon auszugehen, daß dieser Zellstamm zwar Angiotensin I - converting enzyme membrangebunden trägt, nicht jedoch die Enkephalinase A. Dies wird unterstrichen durch kürzlich publizierte Ergebnisse (Palenker et al., 1984), die zeigen, daß Pentobarbital als Inhibitor der Enkephalinase A (Altstein und Vogel, 1980) in Konzentrationen von 2 bis 200 x 10^{-6}M ebensowenig einen Effekt ausübt, wie der Zusatz von Thiorphan zu Captopril die Hemmung der Tyr-Gly-Gly-Bildung zu verstärken vermag. Auf der Zellmembran der Neuroblastomazellen (Klon N 1 E 115) gibt es also das Tripeptid-bildende ACE, was insofern nicht besonders überraschte, als das Vorkommen von ACE auf verschiedenen anderen Neuroblastomazellklonen bereits von Okamura et al. (1981) nachgewiesen wurde.

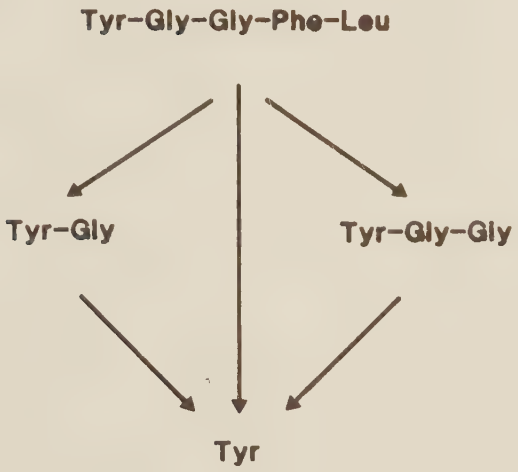
Auch in Inkubationsexperimenten mit primären Astrocyten erwies sich Tyrosin als der Hauptmetabolit. Es konnte ebenfalls ein Abfall der spezifischen Aktivität der Aminopeptidase(n) bei Verwendung von Membranfraktionen gezeigt werden. Da auch bei diesen Zellen ihre Intaktheit nicht primär voraussetzbar war, wurden Experimente an mit primären Astrocyten bewachsenen Plättchen vorgenommen, bei denen die Zellen nicht abgeschabt und aufgenommen werden mußten, ohne daß sich Unterschiede zu den in Suspension erhaltenen Meßwerten ergaben.

Bestatin zeigte analog zu den Neuroblastomazellen eine deutliche Hemmung der Tyrosin-Produktion, die als Beweis der Aminopeptidase-Abkunft der Tyrosin-Bildung zu gelten hat.

Außerdem ist denkbar, daß Aminopeptidaseaktivitäten in der Lage sind, aus den tyrosinhaltigen Metaboliten Tyrosin abzuspalten, so daß das Tyrosin bei den Inkubationsexperimenten nicht notwendigerweise aus einem primären Schritt des Enkephalinabbaus stammen muß, sondern ebenso sekundär als Folge der Metabolisierung der Metabolite entstehen könnte (vgl. Schema 4).

In Hinblick auf die Tyr-Gly-Bildung kann folgendes ausgesagt werden:

1. Das Enzym scheint wie bei den Neuroblastomazellen plasmamembranassoziiert, nicht jedoch plasmamembrangebunden zu sein.
2. Es ist nicht das Produkt der von Gorenstein und Snyder (1979) und später von Hazato et al. (1982) beschriebenen Dipeptidylaminopeptidase, da es nicht durch p-Chloromercuribenzoat oder 1,10-Phenanthrolin gehemmt werden konnte (Daten in der Arbeit nicht gezeigt).



Schema 4: Tyrosinhaltige Enkephalinmetabolite als Substrat von Aminopeptidasen

Auch bei den primären Astrocyten ist das tripeptidbildende Enzym membrangebunden, da es sich in seiner spezifischen Aktivität während der Membranpräparationen mehr als zweifach steigert. Thiorphan in Konzentrationsbereichen von 10^{-8} bis 10^{-6}M unterdrückt die Tyr-Gly-Gly-Produktion gewaltig, wohingegen Captopril (10^{-7} bis 10^{-5}M) in allen Fällen ineffektiv war. Aus letzterem Resultat ist zu folgern, daß es sich bei dem glialen Enzym um die Enkephalinase A handelt.

Auf den ersten Blick muß das Ergebnis der vorliegenden Studie überraschen, wenn man bedenkt, daß eine Lokalisation der Enkephalinase A an der neuronalen Membran stets postuliert worden war, jedoch an einer Nichttumorzelle glialer Herkunft als einziger bisher in der Literatur beschriebenen Zelle der Nachweis der Existenz gelang. Dagegen gelang es an den opiatrezeptor-tragenden, met-enkephalinergen Neuroblastomazellen lediglich, das Vorhandensein von Angiotensin I - converting enzyme (EC 3.4.15.1, Kininase II) zu zeigen. Dies steht in guter Übereinstimmung zu den oben zitierten Ergebnissen an opiatrezeptor-tragenden striatonigralen Neuronen (Llorens-Cortes et al., 1979) und an Neuroblastomazellstämmen (Okamura et al., 1981). Es ergab sich kein Hinweis auf die Existenz von Enkephalinase A an diesem Zellstamm. Dieser Befund deckt sich mit neueren Ergebnissen von Lentzen et al. (1983), die aus Rattengehirnen eine sogenannte "bulk preparation" herstellten, die eine hinreichende Trennung von neuronalen und glialen Zellelementen erlaubt. Hierbei fand sich für die neuronale Fraktion lediglich ein ACE-GEhalt, während sich in der Gliafraktion wie auch hier beschrieben eine Thiorphan-empfindliche Tyr-Gly-Gly-Bildung nachweisen ließ, die ihren Charakteristika nach als Enkephalinase A Aktivität bezeichnet werden muß. Es ergibt sich somit in der bis heute vorliegenden Literatur kein Hinweis auf eine neuronale Lokalisation der Enkephalinase A.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorgelegten Studie war es, Fragen über die Art enkephalinhydrolysierender Peptidasen und deren Lokalisation zu untersuchen. Dabei konnten vorliegende Ergebnisse aus Untersuchungen mit Gehirnhomogenaten und Synaptosomenpräparationen von Mäusen bzw. Ratten der eigenen Arbeit zugrundegelegt werden. Diese Befunde sind mit dem Nachteil behaftet, daß die Frage der Lokalisation dieser Enzyme sowohl auf zellulärer als auch auf subzellulärer Ebene nicht zufriedenstellend beantwortet werden kann.

In den Untersuchungen sollte deshalb das Lokalisationsproblem an Zellkulturen neuronalen (Neuroblastomazellen N 1 E 115) und glialen Ursprungs (primäre Astrocyten) bearbeitet werden; ferner war beabsichtigt, mit Rohmembran- und Plasmamembranpräparationen dieser Zellen auf mögliche Membranständigkeit der Peptidasen zu prüfen. Für die Analyse der Enkephalinmetabolite sollte eine HPLC-Methode aufgebaut werden.

Diese gemeinsam mit Lentzen entwickelte Methode zur Trennung der Enkephaline von ihren tyrosinhaltigen Metaboliten wird in der Arbeit beschrieben. Der Vorzug der Methode liegt in ihrer Zuverlässigkeit, ihrer guten Reproduzierbarkeit und der hohen Auflösung. Mit ihr ist es möglich, die drei Hauptmetabolite des Enkephalinabbaus mit einem einzigen isokratischen System sicher und sauber zu trennen. Durch Experimente an den Zellen und Membranen des opiatrezeptortragenden und met-enkephalinergen Neuroblastoma-Zellstamms N 1 E 115 sowie von primären Astrocyten konnte gezeigt werden, daß durch beide Zelltypen als Hauptmetabolit des (Leu^5)enkephalins Tyrosin gebildet wird. Darüberhinaus ist von den Tyr-Gly-Gly-bildenden Enzymen die Enkephalinase A lediglich auf primären Astrocyten lokalisiert, während die Neuroblastomazellen Angiotensin-converting enzyme (EC 3.4.15.1, Kininase

II) Aktivität zeigen. Sowohl die untersuchten Tyrosin-freisetzenden Aminopeptidasen bei beiden Zelltypen als auch die beiden Tyr-Gly-Gly-bildenden Endopeptidasen sind als plasmamembrangebundene Peptidasen anzusehen.

Die vorgelegten Ergebnisse stellen zusammen mit kürzlich publizierten Untersuchungen an anderen neuronalen und glialen Modellen die Theorie einer neuronalen Lokalisation der Enkephalinase A in Frage.

7 Literaturverzeichnis

Altstein, M.; Vogel, Z. (1980)
In: Littauer, U.Z.; Dudai, Y.; Silman, I.; Teichberg, V.I.; Vogel, Z. (Eds.): Neurotransmitters and their Receptors : 497-507
John Wiley and Sons Ltd., Chichester New York Brisbane Toronto

Amano, T.; Richelson, E.; Nirenberg, M. (1972)
Proc. Nat.Acad. Sci. USA 69 : 258-263

Arregui, A.; Lee, C.-M.; Emson, P.C.; Iversen, L.L. (1979)
Eur. J. Pharmacology 59 : 141-144

Bajusz, S.; Patthy, A.; Kenessy, A.; Graf, L.; Szekely, J.; Ronai, A.Z. (1978)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 84 :1045-1053

Bayon, A.; Rossier, J.; Mauss, A.; Bloom, F.E.; Iversen, L.L.; Ling, N.; Guillemin, R. (1978)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 75 : 3503-3506

Beluzzi, J.D.; Grant, N.; Garsky, V.; Sarantakis, D.; Wise, C.D.; Stein, L. (1976)
Nature 260 : 625-626

Blanchard, S.G.; Chang, K.-J. (1983)
J. Biol. Chem. 258 : 1092-1097

Booher, J.; Sensenbrenner, M. (1972)
Neurobiology 2 : 97-105

Bradbury, A.F.; Smyth, D.G.; Snell, C.R.; Keakin, J.F.W.; Wendlandt, S. (1977)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 : 748-754

Brunette, D.M.; Till, J.E. (1971)
J. Membrane Biol. 5 : 215-224

Buscher, H.M.; Hill, R.C.; Romer, D.; Cardiaux, F.; Closse, A.; Hauser, D.; Pless, J. (1976)
Nature 261 : 423

Chang, K.-J.; Fong, B.T.W.; Pert, A.; Pert, C. (1976)
Life Sciences 18 : 1473-481

Chang, K.-J.; Eckel, R.W.; Blanchard, S.G. (1982)
Nature 296 : 446-448

Craves, F.B.; Law, P.Y.; Hunt, C.A.; Loh, H.H. (1978)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 206 : 492-506

Cuello, A.C.; Paxinos, G. (1978)
Nature 271 : 178-180

Dupont, A.; Cusan, L.; Garon, M.; Alvarado-Urbina, G.; Labrie, F. (1977)
Life Sciences 21 : 907-914

Emson, P.C. (1979)
Progress in Neurobiology 13 : 61-116

Emson, P.C.; Arregui, A.; Clement-Jones, V.; Sandberg, B.E.B.; Rossor, M. (1980)
Brain Research 199 : 147-160

Erdös, E.G.; Johnson, A.R.; Boyden, N.T. (1978)
Biochemical Pharmacology 27 : 843-848

Gilbert, J.A.; Knodel, E.L.; Stenstrom, S.S.; Richelson, E. (1982)
J. Biol. Chem. 257 : 1274-1281

Gorenstein, C.; Snyder, S.H. (1979)
Life Sciences 25 : 2065-2070

Gorenstein, C.; Snyder, S.H. (1980)
Proc. Royal Soc. London B 210 : 123-132

Gosset, W.C. (= Student) (1908)
Biometrika 6 : 1-25

Guyon, A.; Roques, B.P.; Guyon, F.; Foucault, A.; Perdrisot, R.; Swerts, J.P.; Schwartz, J.C. (1979)
Life Sciences 25 : 1605-1612

Hambrook, J.M.; Morgan, B.A.; Rance, M.J.; Smith, C.F. (1976)
Nature 262 : 782-783

Hazato, T.; Inagaki-Shinamura, M.; Katayama, T.; Yamamoto, T. (1982)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 105 : 470-475

Hazum, E.; Chang, K.-J.; Cuatrecasas, P. (1979)
Life Sciences 24 : 137-144

Henderson, G.; Hughes, J.; Kosterlitz, H.W. (1978)
Nature 271 : 677-679

Höllt, V. (1983)
Trends in Neurosciences Jan/1983 : 24-26

Hong, J.S.; Yang, H.-Y.; Fratta, W.; Costa, E. (1977)
Brain Research 134 : 383-386

Hudgin, R.L.; Charleson, S.E.; Zimmerman, M.; Mumford, R.; Wood, P.L. (1981)
Life Sciences 29 : 2593-2601

Hughes, J. (1975)
Brain Research 88 : 295-308

Hughes, J.; Smith, T.W.; Kosterlitz, H.W.; Fothergill, L.A.; Morgan, B.A.; Morris, H.R. (1975)
Nature 258 : 577-579

Iversen, L.L. (1979)
Scientific American 241 No. 3 : 79

Iversen, L.L.; Iversen, S.D.; Bloom, F.E.; Vargo, T.; Guillemin, R. (1978)
Nature 271 : 679-680

Jacquet, Y.; Marks, N.; Li, C.-H. (1976)
In: Kosterlitz, H.W. (Ed.) : Opiates and endogenous opioid peptides : 411-414; Elsevier, Amsterdam

Knight, M.; Klee, W.A. (1978)
J. Biol. Chem. 253 : 3843-3847

Knodel, E.L.; Richelson, E. (1980)
Brain Research 197 : 565-570

Kobayashi, R.; Palkovits, M.; Miller, R.J.; Chang, K.-J.; Cuatrecasas, P. (1978)
Life Sciences 22 : 527-530

Lane, A.C.; Rance, M.J.; Walter, D.S. (1977)
Nature 269 : 75-76

Lentzen, H.; Monden, I.; Linke, J.; Palenker, J. (1983)
Life Sciences 33 : (Suppl. I) 105-108

Llorens-Cortes, C.; Pollard, H.; Schwartz, J.C. (1979)
Neurosciences Letters 12 : 165-170

Lowry, O.H.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193 : 265-275

Malfroy, B.; Swerts, J.-P.; Guyon, A.; Roques, B.P.; Schwartz, J.C. (1978)
Nature 276 : 523-526

Marks, N.; Grynbaum, A.; Naidle, A. (1979)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 74 : 1552-1559

Meek, J.L.; Yang, H.-Y.T.; Costa, E. (1977)
Neuropharmacology 16 : 151-154

Okamura, T.; Clemens, D.L.; Inagami, T. (1981)
Proc. Nat. Acad. Sci USA 78 : 6940-6943

Osborne, H.; Höllt, V.;Herz, A. (1978)
Eur. J. Pharmacology 48 : 219-221

Palenker, J.; Lentzen, H.; Brandt, U. (1984)
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 325 : 214-217

Pert, C.; Pert, A.; Chang, K.-J.; Fong, B.T.W. (1976)
Science 194 : 330-332

Roques, B.P.; Fournié-Zaluski, M.C.; Soroca, E.; Lacomte, J.M.; Malfroy, B.; Llorens, C.; Schwartz, J.C. (1980)
Nature 288 : 286-288

Rossier, J.; Vargo, T.M.; Minick, S.; Ling, N.; Bloom, F.E.; Guillemin, R. (1977)
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74 : 5162-5165

Simatov, R.; Levy, R.; Baram, D. (1982)
Biochimica et Biophysica Acta 721 : 478-484

Simon, E.J.; Bounet, K.A.; Hiller, J.M.; Rieman, M.W.; Merrifield, R.B. (1979)
Biochemical Pharmacology 28 : 3333-3337

Sullivan, A.; Akil, H.; Barchas, J.D. (1978)
Commun. Psychopharmacology 2 : 525-531

Swerts, J.-P.; Perdrisot, R.; Patey, G.; De la Baume, S.; Schwartz, J.C. (1979)
Eur. J. Pharmacology 57 : 279-281

Ueda, H.; Amado, H.; Shiomi, H.; Tagaki, M. (1979)
J. Pharmacol. 56 : 265-267

Wagner, G.W.; Dixon, J.E. (1981)
J. Neurochem. 37 : 709-713

Warren, L.; Glick, M.C.; Nass, M.K. (1966)
J. Cell Physiol. 68 : 269

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt dem ehemaligen Direktor des Pharmakologischen Instituts der Freien Universität, Prof. Dr. med. Hans Herken, für die Überlassung des Themas sowie viele wertvolle Hinweise. Auch für die Unterstützung der stattgehabten Kongressbesuche habe ich zu danken. Den Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts bin ich für die Unterweisung zu Dank verpflichtet. Besonders herausheben möchte ich an dieser Stelle Dr. rer. nat. Hans Lentzen. Für die technische Unterstützung besonders in Bezug auf die Zellkultivierung habe ich den technischen Assistentinnen Frau Ursula Brandt, Frau Ingrid Monden und Frau Ingeborg Reinsch zu danken. Dr. med. B. Agrawal danke ich für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der durchgeführten Membranpräparationen. Nicht zuletzt habe ich meinen Eltern zu danken, deren stets großzügige finanzielle Unterstützung es mir ermöglichte, mich ganz auf die Durchführung des Studiums und dieser Doktorarbeit zu konzentrieren.

Curriculum vitae

26.09.1957	in Berlin-Nikolassee als Sohn des Geschäftsmannes Josef Palenker und seiner Frau, der Apothekerin Marjana Palenker, geborene Israel, geboren
Juni 1976	Abitur an der Goethe-Oberschule (Gymnasium) in Berlin-Lichterfelde (Steglitz)
Oktober 1976	Beginn des Studiums der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin
August 1978	Physikum med. vet. bestanden
April 1979	Zulassung zum 1. vorklinischen Semester Humanmedizin und Studienfachwechsel nach dem 1. klinische Semester med. vet.
März 1980	Physikum med. bestanden
Oktober 1980	Beginn dieser Arbeit am Pharmakologischen Institut der Freien Universität (Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken)
März 1981	Medicum primum bestanden
August 1982	Medicum secundum bestanden
17.10.1983	mündlichen Teil des Medicum tertium bestanden
04.11.1983	Approbation als Arzt
Oktober 1983 bis Februar 1984	Studium med. dent
seit 01.02.1984	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Assistenzarzt an der Chirurgischen Universitätsklinik im Klinikum Charlottenburg der Freien Universität Berlin (Direktor: Prof. Dr. med. E.S. Bücherl)